



INSTITUTO DE BIOQUÍMICA VEGETAL Y FOTOSÍNTESIS

Universidad de Sevilla

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

**Análisis de metabolitos de *Haematococcus pluvialis* en cultivo continuo
durante la acumulación de astaxantina**

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Biología por la licenciada

CRISTINA HOYS HERNÁNDEZ

Directora:

Mercedes García González

Directora:

Esperanza del Río Sánchez

Profesora Titular de la Universidad de Sevilla

Doctora en Biología

Hay un proverbio hebreo que dice...

*“El que da, no debe volver a acordarse; pero el que
recibe nunca debe olvidar”*

Por ello, quiero mostrar mi gratitud a todos aquellos que de una manera u otra han estado cercanos en el proceso de creación de esta tesis, leyendo el todo o las partes, alentando, aconsejando, corrigiendo, o simplemente, avanzando junto a mí en la marcha de los días.

Ante todo, agradecer al Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis por ponerme a mi disposición sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo, así como a las instituciones CSIC y Universidad de Sevilla por la financiación del proyecto.

Al personal de microscopía electrónica del Centro de Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) por su dedicación en el procesamiento de las muestras y en la toma de imágenes en el TEM.

A Miguel y Mercedes muchísimas gracias por la confianza depositada en mí todos estos años, por apoyarme y valorarme siempre.

A mis directoras Mercedes y Esperanza, os agradezco vuestra comprensión en los malos momentos, la paciencia ante los recurrentes errores, así como las palabras de ánimo y el esfuerzo conjunto....gracias Mercedes por hacerme ver que “había mucho” cuando yo creía que “no había nada”, por todas esas correcciones, tu implicación y aportarme todos los recursos necesarios, tanto materiales como intelectuales. Gracias Espe, por haber sentado una base sólida para esta tesis que no hubiera sido posible sin tu trabajo previo con *Haematococcus*. Tu confianza en mí me ha permitido trabajar en libertad y “a mi manera” pero siempre echándome “un alambre” cuando más lo necesitaba.

A Pepe, por estar siempre siempre siempre dispuesto a ayudar en todas esas cosas que solo tú y nada más que tú sabes hacer, por montarme mi instalación “a mi altura”, desmontármela y volverla a montar, cambiar todos los cables y volverlos a cambiar, quitar y poner, poner y quitar, encender luces y entender por qué no se volvían a apagar, por arreglar los desastres en el microscopio, por ayudarme en con las

determinaciones cuando ya “me cogió el toro”, por aportarme tranquilidad en los momentos de histeria, por alegrarte tanto como yo de los éxitos y por sufrir conmigo los obstáculos, por tantas y tantas cosas que podría seguir diciendo y no terminaría nunca, eso sí, siempre con una sonrisa e infinita paciencia.

A “la Rebe”, por tu apoyo incondicional, por haber realizado tu trabajo aquí con esa pasión contagiosa que terminaste por contagiarme, por ser fuente constante de motivación e ideas innovadoras, por las innumerables conversaciones que se convertían en “miniclases” de bioquímica y que tanto me han ayudado, por los consejos que me regalaste y el apoyo que me brindaste a lo largo de esos años, por las llamadas de ánimo cuando no llegaba...

A mis compañeros, a mi paisana alcalareña Alicia, por interesarte por mí en todo momento, por tu dedicación e implicación personal aquel día que lo empecé a ver todo distinto, por tomar mi trabajo como si fuera tuyo y estar siempre dispuesta a ayudarme. A Carlos, por tus innumerables pinchazos, por permitirme “trastear” el cromatógrafo, por aguantarme horas y horas cambiándolo todo en los equipos, por aportarme tranquilidad cuando surgían los problemas.

A Irene, TE DEBO MUCHO. Gracias por hacerme fácil lo difícil. Por ayudarme en el día a día de mis últimos experimentos, por enseñarme las “cosas modernas” que tanto tiempo me han ahorrado, y sobre todo, por hacerte cargo del formato con ese manejo impecable del Word, por ordenar y “poner bonita” mi tesis como si fuera tuya, por recordarme en mis inicios, por recordarme también por qué elegí este camino.

A Manuel y M^a José por poner a mi disposición vuestros conocimientos fotosintéticos y ayudarme con el PAM.

A Esther, por avisarme a tiempo de “lo feas que eran mis gráficas” y enseñarme cómo se deben hacer (menos mal que lo hiciste), por avisarme a tiempo de por “dónde sí” y por “dónde no”, por avisarme a tiempo de lo que quedaba por venir. A PPL, por tu ayuda identificando los orgánulos de “mi niña”. A Inma, por poner tu avanzada experiencia por delante de mí, por hacerme saber en todo momento que podía contar contigo, por aportarme siempre tu visión acertada de las cosas, por apoyarme desde el primer momento.

A mi vecina de mesa y sin embargo amiga Ani, por enseñarme el significado del “sentido común” y servirme como ejemplo de seguridad en un mismo, por ser “testigo” de muchos de mis avances y retrocesos al igual que yo fui “testigo” de mucho de los tuyos ;). A mi Martita, por esa llamada telefónica justo al final para alentarme y recordarme que estaba disponible para lo que necesitase.

A mis amigas de siempre, a Espe, por estar ahí siempre disponible para lo que necesite, para que te ponga la cabeza “como un bombo”, por tu admiración continua por mi trabajo, por entenderme y ayudarme cuando “no me daba la vida”, por decirme una y otra vez....”¡porque es que la que vale, vale!”, por tantas y tantas cosas, gracias comadrita. A mi “coautora” Almudena, por ser mi “Pepito Grillo” siempre con tu frase “*ya sabes cuál es tu objetivo*”, por interesarte por mi trabajo constantemente y reflejar una ilusión que yo necesitaba recobrar, por aportar algunas ideas aunque no se llegaran a materializar (por ahora) y no dejar que desista por el camino...A mi Mari, por su ayuda para que no se me “enquistara”, por aportarme alegría siempre y quitarle hierro a todo, por ser mi confesora personal, y sobretodo, tranquilizarme con solo escucharte.

A mi Cani, a mi Bartolita, porque simplemente eres una de mis personas favoritas, por arrancarme una sonrisa siempre, por entenderme, tranquilizarme y ayudarme, por todos esos desayunos, por esas conversaciones telefónicas, por dar sentido común a todo lo que no tiene sentido, por echarle “sirope” a los problemas, Elena, gracias por estar siempre ahí.

A mi primo Paco, por poner la guinda final, por aplicar tu arte en la ilustración de la portada.

A ti, a Rubén, por aparecer justo a tiempo y sobretodo, por quedarte, por todas las risas cuando las necesitaba, por tu seguridad ciega en mí, por priorizar y sufrir lo que no era tuyo como si lo fuera, por los “holis” que nunca faltan y que tranquilizan.

A mi familia, que me habéis demostrado lo importante que soy para vosotros y me he dado cuenta de lo importante que sois para mí. A mi titi y mi abuela, por alimentar mis neuronas semanalmente y estar continuamente pendiente de que no me faltase nada.

A mi padre y mis dos estrellas. Por estar aunque yo no esté. Por vuestro apoyo incondicional, consejos, comprensión con mis decisiones (a veces no acertadas), por

respetar el camino que elegí y que me ha traído aquí, por hacer mi prioridad la vuestra, por la ayuda en los momentos difíciles, por llevarme los pies a tierra, por abrirme puertas que no sabía ni dónde estaban, por cerrarme otras que debía cerrar, por sostenerme para que no me caiga y levantarme cuando me caí.

A mi hermana por servirme como ejemplo con su actitud, seriedad, tesón y su trabajo constante. Por decirme aquel día que me reiría de todo, por ayudarme a arrancar de nuevo, por recoger la toalla y volvérmela a dar.

A mi madre, por recordarme que yo sí que puedo y ayudarme en “esas cosas que no se ven”

A mi padre, por enseñarme a ver todo con los “ojos de la inteligencia”, por creer siempre en mí, porque todo empezó en Barbate con los cuadernos Santillana y “mira donde hemos acabao!!”

Porque creía que no llegaba...porque nunca trabajé tanto y aprendí más...porque muchas han sido las veces que imaginaba como sería el momento en el que escribiría estas líneas y, una vez más, todo llega...porque cierro una etapa y doy comienzo una nueva...

GRACIAS a quien siempre está,
a quien ha querido estar y a quien acaba de llegar.

a mis padres

a ti

1	INTRODUCCIÓN	15
1.1	CAROTENOIDES	17
1.1.1	<i>Astaxantina: naturaleza química y estructura</i>	18
1.1.2	<i>Aplicaciones de la astaxantina</i>	20
1.2	PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA	22
1.2.1	<i>Producción de astaxantina sintética</i>	22
1.2.2	<i>Producción de astaxantina natural</i>	23
1.3	MERCADO DE ASTAXANTINA	24
1.4	LA MICROALGA <i>Haematococcus pluvialis</i>	25
1.4.1	<i>Morfología</i>	25
1.4.2	<i>Biosíntesis de astaxantina</i>	29
1.4.3	<i>Condiciones que promueven la acumulación de astaxantina</i>	32
1.4.4	<i>Producción industrial de astaxantina</i>	33
1.5	METABOLÓMICA	36
2	MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.1	MATERIAL BIOLÓGICO Y COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	43
2.2	CULTIVO ESTANCO EN CÁMARA TERMOSTATIZADA	45
2.3	CULTIVO CONTINUO EN FOTOQUIMIOSTATO	46
2.4	MÉTODOS Y DETERMINACIONES ANALÍTICAS	49
2.4.1	<i>Determinación de biomasa por peso seco</i>	49
2.4.2	<i>Liofilización de la biomasa</i>	50
2.4.3	<i>Determinación de la composición bioquímica</i>	50
2.4.3.1	Determinación de carotenoides.	50
2.4.3.2	Determinación de ácidos orgánicos mediante CG-MS.	52
2.4.3.2.1	Calibrado	52
2.4.3.2.2	Preparación de muestras	52
2.4.3.2.3	Derivatización	53
2.4.3.2.4	Cuantificación	54
2.4.3.3	Determinación de ácidos orgánicos mediante HPLC.	55
2.4.3.3.1	Preparación de muestras	55
2.4.3.3.2	Detección	55
2.4.3.4	Determinación de azúcares mediante CG-MS.	56
2.4.3.4.1	Calibrado	56
2.4.3.4.2	Cuantificación	56
2.4.3.5	Determinación de ácidos grasos	57
2.4.3.6	Determinación de aminoácidos libres	59
2.4.3.7	Determinación de composición elemental	60
2.4.3.8	Determinación de parámetros fotosintéticos	60
2.5	CITOMETRÍA DE FLUJO	62

2.6	MICROSCOPÍA ÓPTICA	62
2.7	MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA	62
2.8	MEDIDA DE IRRADIANCIA	63
2.9	CÁLCULO DEL SUMINISTRO ESPECÍFICO DE NITRATO (SEN)	64
2.10	TRATAMIENTO DE DATOS	64
3	RESULTADOS	65
3.1	GENERACIÓN DE CULTIVOS CON DISTINTO NIVEL DE ACUMULACIÓN DE ASTAXANTINA	67
3.1.1	<i>Efecto de la velocidad de dilución y concentración de nitrato en el medio de aporte</i>	<i>68</i>
3.1.2	<i>Efecto de la irradiancia incidente</i>	<i>76</i>
3.1.2.1	Ciclos luz - oscuridad (12:12)	76
3.1.2.2	Ciclo solar simulado con irradiancia máxima de 2000 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$	77
3.2	OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA MEDIR ÁCIDOS ORGÁNICOS Y AZÚCARES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES-MASAS	79
3.3	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y METABOLÓMICA DE CULTIVOS CON DISTINTO NIVEL DE ACUMULACIÓN DE ASTAXANTINA DURANTE EL CICLO SOLAR SIMULADO	87
3.3.1	<i>Morfología</i>	<i>87</i>
3.3.2	<i>Metabolómica en el periodo de iluminación</i>	<i>101</i>
3.3.2.1	Carotenoides	101
3.3.2.2	Ácidos grasos	102
3.3.2.3	Aminoácidos libres	103
3.3.2.4	Ácidos orgánicos	105
3.3.2.5	Azúcares	105
3.3.2.6	Parámetros fotosintéticos	106
3.3.3	<i>Metabolómica en el periodo de oscuridad</i>	<i>109</i>
3.3.3.1	Carotenoides	109
3.3.3.2	Ácidos grasos	109
3.3.3.3	Aminoácidos libres	110
3.3.3.4	Ácidos orgánicos	112
3.3.3.5	Azúcares	112
4	DISCUSIÓN	115
5	CONCLUSIONES	143
6	BIBLIOGRAFÍA	147
7	ÍNDICE DE FIGURAS	171
8	ÍNDICE DE TABLAS	179
9	ABREVIATURAS	185
10	ANEXO	189



1.1 CAROTENOIDES

Los carotenoides son pigmentos liposolubles del grupo de los isoprenoides, sintetizados de forma natural por plantas superiores, algas y microalgas, así como por organismos no fotosintéticos como bacterias y hongos (Goodwin 1980). Están presentes en todos los tejidos fotosintéticos, donde desempeñan un papel vital, ya sea participando en el proceso de transferencia de energía, absorbiendo la luz entre 400 y 500 nm o protegiendo el centro de reacción, gracias a su actividad antioxidante (Varela et al. 2015). Los colores amarillo, anaranjado y rojizo de las frutas y verduras se deben a la presencia de una secuencia lineal de al menos siete dobles enlaces (cromóforo) en estos compuestos.

Desde el punto de vista químico, la estructura básica de un carotenoide es una molécula lineal de 40 átomos de carbono con dobles enlaces conjugados y una serie de ramificaciones con grupos metilo e hidroxilo. Se dividen en dos grupos: carotenos y xantofilas. Los primeros no presentan oxígeno en sus anillos terminales, es decir, sólo están compuestos por carbono e hidrógeno, mientras que las xantofilas son derivados oxigenados, donde el oxígeno puede estar presente en forma de grupos hidroxilo (luteína), grupos ceto (cantaxantina) o bien combinaciones de ambos (astaxantina) (Breithaupt 2007; Higuera-Ciapara et al. 2006). Se conocen alrededor de 700 compuestos de esta familia, derivados del licopeno (Figura 1).

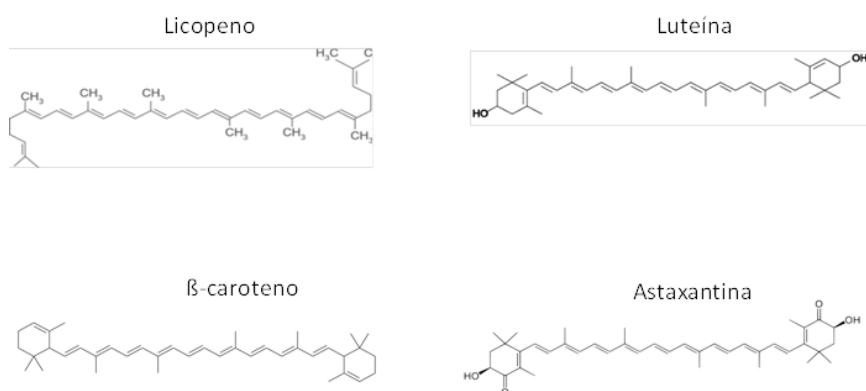


Figura 1. Estructura química de algunos carotenoides.

Los carotenoides también se pueden clasificar en primarios y secundarios. Los primarios como la luteína, α y β caroteno y violaxantina, actúan como componentes estructurales y funcionales del aparato fotosintético de las células y, por tanto, son esenciales para su supervivencia en condiciones de cultivo fotoautotrófico (Demmig-Adams et al. 1996). Los carotenoides secundarios como la astaxantina, cantaxantina y zeaxantina, se acumulan en cantidades considerables en cuerpos lipídicos dentro o fuera de los cloroplastos cuando las células se exponen a diferentes condiciones de estrés. Actualmente, se cree que pueden ejercer un papel como filtros fotoprotectores y como antioxidantes, previniendo la acumulación de radicales de oxígeno (Boussiba 2000; Demmig-Adams et al. 2002; Guerin et al. 2003; Jin et al. 2003). La presencia de gran número de dobles enlaces permite a los carotenoides interaccionar con el oxígeno singlete, amortiguar los estados triplete de la clorofila y secuestrar de las especies reactivas de oxígeno, disipando el exceso de energía (Demmig-Adams y Adams 2002). Una dieta rica en carotenoides puede retrasar el inicio de muchas enfermedades causadas por la acumulación de radicales libres así como ejercer un efecto protector frente a los rayos UV, mejorar el sistema inmune, prevenir el desarrollo del cáncer, diabetes, cataratas, degeneración macular y enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares (Gong y Bassi 2016; Varela et al. 2015).

1.1.1 ASTAXANTINA: NATURALEZA QUÍMICA Y ESTRUCTURA

La astaxantina, 3,3'-dihidroxi-8,8-caroteno-4,4'-diona, es un carotenoide de la familia de las xantofilas formada por grupos hidroxilo y ceto en posiciones 3 y 4 de cada anillo terminal (Figura 1) que contribuyen a una mayor capacidad antioxidante y le confiere una naturaleza más polar respecto a otros carotenoides. Tiene un peso molecular de 596,8 Da y su fórmula es $C_{40}H_{52}O_4$. Posee una cadena poliénica de once dobles enlaces conjugados, responsable del intenso color rojo brillante del cromóforo. Es uno de los principales pigmentos presentes en el medio acuático, contribuyendo a la coloración típica del caparazón de muchos crustáceos (camarón, quisquilla, gamba,



langosta, etc.), de la carne de salmónidos y de las plumas de algunas aves de estos ambientes (flamenco).

Este pigmento tiene dos carbonos asimétricos (dos centros quirales) en la posición 3 y 3', sobre los anillos bencénicos al final de la molécula. Cuando los grupos hidroxilo se unen sobre el plano de la molécula se dice que están en la configuración R y cuando los grupos hidroxilo se unen bajo el plano de la molécula se dice que están en la configuración S. Por tanto, presenta tres estereoisómeros dependiendo de la orientación espacial del grupo hidroxilo en el carbono quiral número 3: 3S, 3'S 3R, 3'S; y 3R, 3'R (Camacho Kurmen et al. 2013) (Figura 2). Además, los dobles enlaces de la parte lineal de la molécula dan lugar a los isómeros geométricos (*cis*, *trans*). La forma más estable, desde el punto de vista termodinámico, es la forma *trans* en todos sus carbonos, puesto que los grupos metilo de la parte lineal de la molécula no compiten por el espacio. De todos estos isómeros, el 3S, 3'S es el más abundante en la naturaleza, encontrándose en la microalga *Haematococcus pluviialis* o en el salmón salvaje (Higuera-Ciapara et al. 2006; Nguyen 2013).

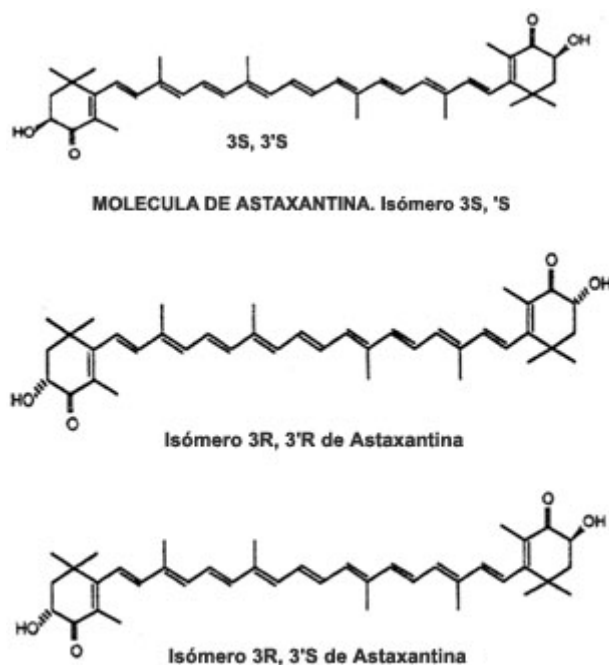


Figura 2. Estereoisómeros de la molécula de astaxantina.

Se considera uno de los antioxidantes más potente de la naturaleza ya que los electrones de la región descentralizada pueden ser donados para reducir moléculas oxidadas y convertirlas en productos más estables. En términos de capacidad antioxidante, la astaxantina es 65 veces más potente que la vitamina C, 54 veces más que el β -caroteno y 100 veces más que el α -tocoferol (Cyanotech, 2015; Shah et al. 2016)

La molécula de astaxantina puede presentarse libre (inestable y particularmente susceptible a la oxidación), conjugada con proteínas, como por ejemplo en el músculo del salmón o en el exoesqueleto de la langosta, o con los grupos hidroxilo de los anillos terminales esterificados con ácidos grasos, aumentando su hidrofobicidad y su actividad antioxidante. En la microalga *Haematococcus pluvialis* la forma esterificada monoéster es la predominante (Guerin et al. 2003; Hussein et al. 2006).

1.1.2 APLICACIONES DE LA ASTAXANTINA

La astaxantina comercial proviene tanto de fuentes naturales como sintéticas. La de síntesis química se genera a partir de derivados del petróleo, y es una mezcla 1:2:1 de isómeros (3S, 3'S), (3R, 3'S) y (3R, 3'R) respectivamente, en forma libre. La astaxantina natural tiene una orientación estereoquímica diferente formada sólo por el 3S, 3'S, produciendo una pigmentación más fuerte. Además, la de origen químico, al no estar esterificada con ácidos grasos, tiene menor capacidad antioxidante (Guerin et al. 2003; Higuera-Ciapara et al. 2006).

Respecto a sus aplicaciones, la astaxantina se utiliza en la alimentación animal (en su forma sintética principalmente) y como producto nutracéutico (pigmento natural) con un mercado emergente en bebidas energéticas, como suplemento dietético (Capelli y Cysewski 2013; Shah et al. 2016) y en acuicultura (Liu et al. 2014).

Astaxantina en la alimentación animal: La coloración de salmónidos y crustáceos se percibe por los consumidores como indicativo de alta calidad y se debe principalmente a la presencia de astaxantina, que se acumula en la carne y la piel.



También es responsable del color anaranjado que poseen los peces ornamentales. La astaxantina no puede ser sintetizada por los animales, por lo que debe ser incluida en la dieta (Guerin et al. 2003; Lorenz R.T. y Cysewski 2000). Actualmente se incluye en piensos para la alimentación animal para incrementar la pigmentación de la yema de huevo en aves de corral, potenciar el valor nutritivo, mejorar los tejidos musculares, aumentar la fertilidad y disminuir la mortalidad (Breithaupt 2007; Lorenz R.T. y Cysewski 2000; Shah et al. 2016).

En un medio acuático natural, las microalgas sintetizan astaxantina que llega a los peces a través de la cadena trófica (Domínguez et al. 2005). Sin embargo, en las piscifactorías, los peces y los crustáceos no tienen acceso a fuentes naturales de astaxantina, por lo que se incluye en el pienso, normalmente en su forma sintética (Higuera-Ciapara et al. 2006; Yuan et al. 2011), aunque se ha demostrado que se obtienen mejores rendimientos utilizando astaxantina natural.

Astaxantina como producto nutracéutico: Un metabolismo normal aerobio genera moléculas oxidativas, como hidroxilos, peróxidos, y especies reactivas del oxígeno (singlete). Cantidades excesivas de estos compuestos pueden resultar peligrosas debido a su elevada reactividad con los componentes intracelulares, oxidando proteínas, lípidos, carbohidratos e incluso ADN, provocando daños que pueden derivar en diferentes enfermedades como degeneración macular, retinopatía, carcinogénesis, aterosclerosis y Alzheimer (Di Mascio et al. 1991; Higuera-Ciapara et al. 2006).

En los últimos años, se ha incrementado el interés por el consumo de los llamados “alimentos funcionales”, productos naturales que además de su aporte nutritivo puedan reducir riesgos para la salud. La astaxantina de origen natural (obtenida a partir de microalgas o extractos de levadura) se comercializa bajo este concepto. Se le reconocen importantes cualidades: actividad anticancerígena, prevención de enfermedades cardiovasculares, estimulación del sistema inmune, fotoprotección frente a rayos UV, efectos antiinflamatorios, antimicrobiano (*Helicobacter pylori*), en la salud ocular (evitando la progresión de cataratas y degeneración macular), efecto protector en enfermedades crónicas como la *diabetes*

mellitus, enfermedades hepáticas y neurodegenerativas (Guerin et al. 2003; Higuera-Ciapara et al. 2006; Hussein et al. 2006; López-Roldán 2012; Shah et al. 2016).

La astaxantina de origen natural está aprobada desde 1987 como colorante en los piensos por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA). También lo está como suplemento dietético destinado al consumo humano en los Estados Unidos, Canadá, Japón y varios países europeos (Cysewski and Lorenz 2004; Yuan et al. 2011). Sin embargo, hasta el momento, no hay aprobación de EFSA (European Food Safety Authority) para la aplicación terapéutica. La Agencia de Normas Alimentarias del Reino Unido (Food Standards Agency, FSA) ha concedido la denominación de “nuevo alimento” a extractos de *Haematococcus pluvialis* obtenidos mediante CO₂ supercrítico como disolvente, mientras que la FDA ha catalogado a la astaxantina de *Haematococcus pluvialis* como una sustancia “generalmente reconocida como segura” lo que se conoce como estado “GRAS” (Generally Recognized As Safe) (Capelli y Cysewski 2013; Shah et al. 2016). En 2014, se comercializaron las primeras bebidas energéticas conteniendo astaxantina natural.

1.2 PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA

1.2.1 PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA SINTÉTICA

Aproximadamente el 95% de la astaxantina que se comercializa es sintética. En 1979, la empresa Hoffman – La Roche (cuya división “Vitamins and Fine Chemicals” fue absorbida por DSM) registró la patente (US4245109). En 1990, comenzó la producción de astaxantina sintética a gran escala cubriendo prácticamente la totalidad del mercado. Actualmente, las empresas más importantes que producen y comercializan astaxantina sintética son DSM (DSM Carophyll® Pink 10% CWS) y BASF (BASF Lucantin® Pink) (Nguyen 2013).



1.2.2 PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA NATURAL

La producción de astaxantina natural se puede realizar a partir de desechos de caparazones de crustáceos (camarones, krill o cangrejo), de levaduras, bacterias o microalgas. Antes de que la astaxantina procedente de *Haematococcus pluvialis* estuviera disponible comercialmente, las fuentes naturales de astaxantina eran el aceite y harina de krill, aceite de cangrejo o la levadura *Phaffia rhodozyma*. Sin embargo, estas fuentes tienen bajas concentraciones de astaxantina que van desde 0,15 % en el krill hasta 0,40 % en la levadura. Como consecuencia, se requieren grandes cantidades de estos compuestos para una pigmentación eficiente. En el caso de las harinas procedentes del krill, se utilizan métodos de secado a altas temperaturas que podrían desnaturalizar los pigmentos. Además, en este proceso se generan productos que contienen un alto porcentaje de ceniza y quitina, lo que disminuye significativamente la digestibilidad de los peces y limita la utilización de este producto en la elaboración de piensos.

La levadura *Phaffia rhodozyma* fue el primer organismo explotado para la obtención de astaxantina natural. La producción por la levadura *Phaffia rhodozyma* es interesante desde el punto de vista de la productividad, porque es un microorganismo de crecimiento rápido capaz de utilizar distintas fuentes de carbono y nitrógeno alcanzando altas densidades celulares (Nguyen 2013) aunque el contenido en astaxantina sea bajo (Higuera-Ciapara et al. 2006; Lorenz y Cysewski 2000) y se presente en la forma no esterificada (Capelli y Cysewski 2013). Además, produce el isómero (3R, 3'R) que es menos eficiente como antioxidante que el producido por *Haematococcus pluvialis* (3S, 3'S). Se han podido obtener mutantes de *Phaffia rhodozyma* en las enzimas de la ruta de biosíntesis de astaxantina que han mejorado los rendimientos, llegando a alcanzar valores del 1 % de la biomasa (Schmidt et al. 2011). Actualmente, la compañía *Naturxan* comercializa el producto Aquasta® con astaxantina procedente de la levadura para la fabricación de piensos destinados a la acuicultura.

La astaxantina procedente de microalgas, constituye una interesante alternativa: *Chlorella zofingiensis* y *Chlorococcum sp.* acumulan un 0,7 % de pigmento en la biomasa seca, *Scenedesmus sp.* un 0,3 % (Liu et al. 2014; Nguyen 2013), destacando *Haematococcus pluvialis* que puede llegar a acumular hasta un 3-4 % del pigmento en la biomasa seca en el morfotipo de quiste (Boussiba 1999; 2000). A pesar de este elevado contenido, debido a las dificultades para su cultivo, se obtienen rendimientos similares a los mutantes de *Phaffia rhodozyma* mencionados anteriormente (Domínguez-Bocanegra et al. 2007).

Actualmente existe un creciente mercado de la astaxantina natural a pesar de su alto costo de producción, debido a la mayor capacidad antioxidante y a los beneficios que confiere a la salud. En enero del 2014, gracias a la iniciativa de *Fuji Chemical Industry Co Ltd.*, *Algatechnologies Ltd.* y *Cyanotech Corporation*, se creó la asociación “NAXA” (Natural Algae Astaxanthin Association), para potenciar el consumo de la astaxantina natural frente a la sintética (Food News Latam® www.foodnewslatam.com).

Otra fuente de astaxantina natural es el aceite de krill, que combina sinérgicamente las propiedades antioxidantes de la astaxantina con los omega-3 del aceite del pescado. Se comercializa por distintas empresas y a precios muy económicos.

A partir de bacterias, concretamente de la cepa *Methylobacterium extorquens*, se prepara un extracto recientemente comercializado por *KnipBio* (www.salmonexpert.cl), para la elaboración de piensos.

1.3 MERCADO DE ASTAXANTINA

En el año 2017 se estimó el valor comercial de los carotenoides en cerca de 1.500 millones de dólares, con la oportunidad de crecer hasta 2.000 millones de dólares en 2022, con una tasa de crecimiento anual del 5,7 % (*The Global Market for Carotenoids*, 2018; <http://bccresearch.com>) siendo el β -caroteno el carotenoide con mayor importancia económica, seguido de la luteína y la astaxantina (Figura 3).



Concretamente, el mercado mundial de astaxantina factura anualmente más de 288,7 millones de dólares estimándose que puede llegar a alcanzar un valor de 426,9 millones de dólares para 2022 con una tasa de crecimiento anual del 8,1 %. Actualmente, el precio de la astaxantina sintética es de 2000 dólares kg^{-1} , mientras que la de origen natural generada mediante la fermentación de levaduras tiene un precio de 2500 dólares kg^{-1} y la que se obtiene a partir de microalgas de 7000 dólares kg^{-1} (Industry Experts, 2015; Nguyen 2013).

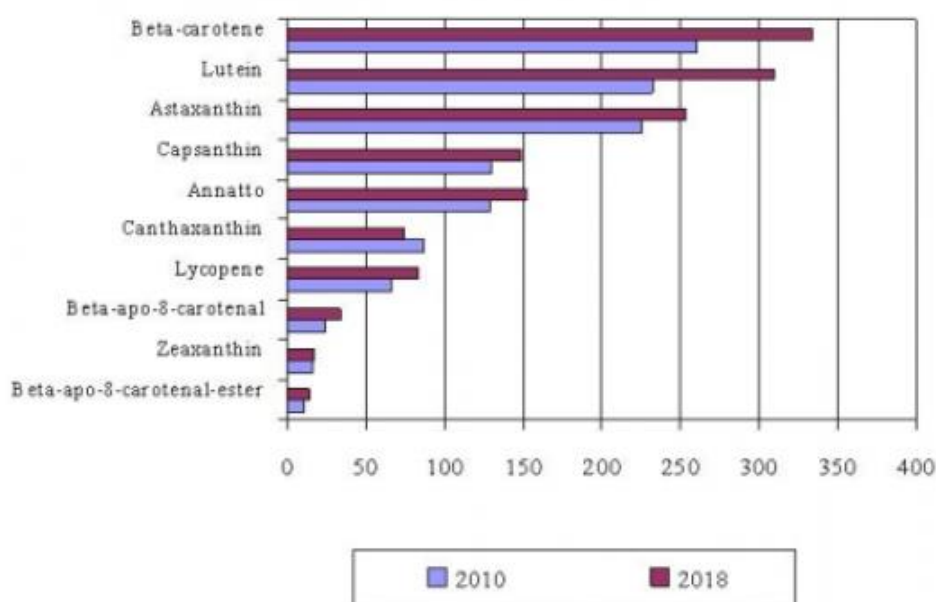


Figura 3. Evolución del mercado de carotenoides (millones de dólares) en el periodo 2010 – 2018.
Fuente: BBC Research.

1.4 LA MICROALGA *Haematococcus pluvialis*

1.4.1 MORFOLOGÍA

Haematococcus pluvialis es una microalga unicelular biflagelada de agua dulce que pertenece a la clase Clorofíceas, orden Volvocales, familia *Haematococcaceae*. Fue descrita por primera vez en 1844 por J. Von Flotow y más tarde en 1899, Tracy Elliot Hazen presentó un amplio estudio sobre su biología y ciclo de vida (Hazen 1899).

Haematococcus pluvialis se encuentra preferentemente en depósitos de agua dulce pequeños y temporales y está ampliamente distribuida en hábitats de todo el mundo (Shah et al. 2016).

Posee un ciclo celular complejo, con distintas formas celulares, que evolucionan en función de las condiciones ambientales (Domínguez et al. 2006; Elliot 1934). Se han descrito cuatro morfotipos principales (Figura 4): células flageladas (crecimiento vegetativo), células palmeloides (esféricas, sin flagelos que conservan su capacidad de división), quiste o aplanospora (forma de resistencia, pared engrosada, sin crecimiento) y microzoide (flageladas de pequeño tamaño presuntos gametos de la reproducción sexual) (Gu et al. 2013; Shah et al. 2016).

Célula flagelada o macrozoide (Figura 4 A): se caracteriza por su forma de pera con un tamaño entre 8 y 50 μm . Es una célula biflagelada móvil. Tiene el cloroplasto en forma de copa con una pronunciada papila exterior de la que emergen los dos flagelos, perforando la pared de celulosa. Presenta numerosos pirenoides y vacuolas contráctiles dispersas. Es característica la presencia de una pared celular separada del protoplasto y conectada a éste a través de puentes citoplasmáticos. Estas células vegetativas de crecimiento rápido predominan en condiciones favorables de cultivo en la etapa temprana de crecimiento vegetativo.

Célula palmeloide (Figura 4B y C): célula verde con un tamaño entre 20 y 50 μm que presenta un protoplasto esférico, ha perdido los flagelos y tiene la pared celular delgada. Es una forma inmóvil pero que conserva su capacidad de división (B). En ciertas condiciones de estrés, la pared se engrosa y empieza a acumular astaxantina en el centro del citoplasma, produciendo una forma bicolor, roja en el centro y verde en la periferia (C).

Quiste o aplanospora (Figura 4D): es una forma de resistencia que aparece bajo condiciones desfavorables de crecimiento. Es de mayor tamaño, pudiendo llegar hasta 70 μm y posee una pared celular muy gruesa y resistente. El proceso de enquistamiento implica una serie de cambios fisiológicos y de actividad celular (Boussiba 2000) que suelen ir acompañados de una gran acumulación de carotenoides



secundarios, particularmente astaxantina, en vesículas lipídicas ubicadas en el citoplasma, lo que proporciona el color rojo brillante característico de estas células.

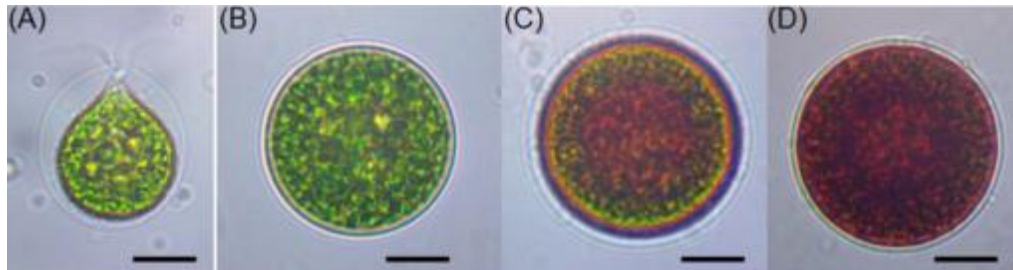


Figura 4. Morfotipos de *Haematococcus pluvialis* A: célula flagelada o macrozooide. B: célula palmeloide. C: Célula palmeloide en transición a quiste. D: quiste o aplanospora. Escala 10 μm (Shah et al 2016).

Microzooide (Figura 5): designa a células vegetativas móviles de pequeño tamaño (5-10 μm) que pueden generarse a partir de los quistes en ciertas condiciones. Se caracterizan por un movimiento muy rápido durante las primeras horas de vida. Algunos autores (Peebles 1909; Triki et al. 1997) sostienen que podrían ser gametos, relacionados con una reproducción sexual en esta microalga, aunque la existencia de dicha forma de reproducción en *Haematococcus pluvialis* no está claramente establecida.

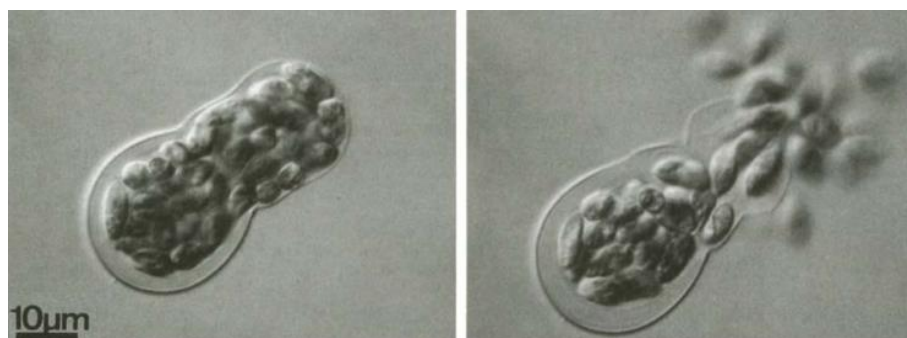


Figura 5. Microzooides antes y después de ser liberados. Fuente: Triki et al. 1997

Haematococcus pluvialis posee un ciclo celular complejo que aun no está claramente descrito, con distintos morfotipos que cambian dependiendo de los parámetros del cultivo (Elliot 1934). Las células acumulan astaxantina en diferente

grado (células “rojizas”) en función del estrés al que estén sometidas (Lee y Ding 1994). Algunos autores defienden que la transición entre morfotipos sigue una secuencia cíclica, (Kobayashi et al. 1997), mientras que otros postulan que los distintos morfotipos se encuentran interrelacionados (Domínguez et al. 2006). La Figura 6 ilustra ciclos de vida de la microalga propuesto por distintos autores.

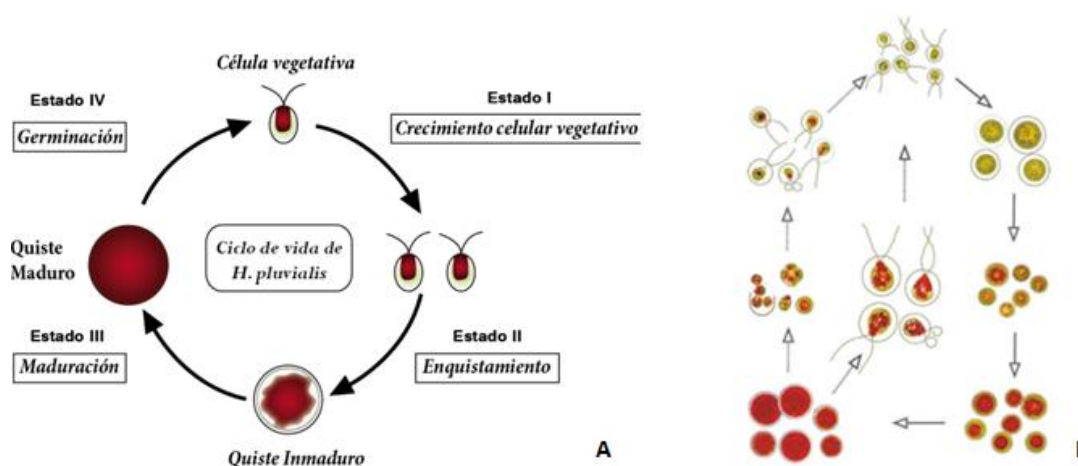


Figura 6. Ciclos de *Haematococcus pluvialis*. Fuentes: modificado de Kobayashi et al. 1997 (A) y Domínguez et al. 2006 (B).

En condiciones óptimas, el cultivo está compuesto mayoritariamente por células vegetativas verdes, con capacidad de crecimiento. Cuando las condiciones de cultivo se hacen desfavorables, aparecen células palmeloides con acumulación de astaxantina en la zona central conservando su capacidad de división. Si se prolonga la situación de estrés, se generan quistes, como forma de resistencia, que pueden persistir durante periodos largos. Cuando las condiciones de cultivo vuelven a ser favorables, las células reversion al estadio de quiste al de célula vegetativa. Durante este proceso, denominado germinación, las células sufren grandes cambios en un periodo de tiempo relativamente corto, perdiendo la pared celular rígida, que es sustituida por la matriz gelatinosa, más lábil y degradando la astaxantina acumulada (Kobayashi et al. 1997). Sin embargo, existen otras propuestas que defienden que los cambios de un morfotipo a otros no sigue una secuencia lineal, y que se pueden



producir cambios entre un estadio y otro en respuesta a las condiciones ambientales. Cuando las condiciones son adecuadas para el crecimiento de la población, las células revierten desde el estadio de aplanospora al de célula vegetativa verde, bien convirtiéndose primero en palmeloides rojizas y posteriormente en flageladas rojizas, o sin necesidad de pasar por el estadio de palmeloides rojizas (Domínguez et al. 2006).

Su composición bioquímica varía dependiendo del morfotipo. En la etapa verde, *Haematococcus pluvialis* tiene un contenido en proteínas en torno al 30 - 45 % y un 15 - 17 % de carbohidratos. A medida que las células empiezan a acumular astaxantina, el contenido en proteínas disminuye mientras que el de carbohidratos se duplica. Además, la producción de astaxantina está acompañada de una síntesis de triacilglicerol (TAG), ya que es el sustrato para la esterificación del pigmento.

Durante la transición de las células verdes a quistes, se produce una reducción de la fotosíntesis, con disminución de la actividad del PSII, pérdida del *citocromo b6f* con la consiguiente reducción del transporte de electrones y aumento de la tasa de respiración (Boussiba 2000; Shah et al. 2016).

Respecto a su cultivo, *Haematococcus pluvialis* puede crecer en condiciones autotróficas, heterotróficas (empleando acetato, malonato, carbohidratos o piruvato) y mixotróficas (Kobayashi et al. 1991, 1993; Orosa et al. 2001, 2005). En los cultivos heterotróficos, la productividad de astaxantina no es buena ya que crece a una tasa relativamente baja ($0,22 \text{ d}^{-1}$) y acumula pocas cantidades del pigmento. Además presenta un alto riesgo de contaminación por hongos o bacterias (Kobayashi et al. 1992). Los cultivos mixotróficos mejoran esta productividad, llegando a valores del 2 % en la biomasa (Shah et al. 2016), pero la máxima productividad se obtiene en los cultivos autotróficos obteniendo un 4 % en la biomasa (Boussiba 2000).

1.4.2 BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA

Como se ha comentado, la biosíntesis de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* es un proceso complejo altamente regulado que tiene lugar bajo condiciones de estrés y va acompañado por un incremento en el contenido lipídico. La astaxantina

esterificada se deposita en los cuerpos lipídicos citosólicos (Boussiba y Vonshak 1991; Shah et al. 2016).

El isopentenil pirofosfato (IPP), intermediario clave en la síntesis de carotenoides, puede originarse a partir de dos vías diferentes: la vía universal del acetato-mevalonato o MVA (localizada en el citosol de células eucariotas, arqueobacterias y hongos) y la vía del no-mevalonato o MEP (localizada en el cloroplasto de eubacterias, algas verdes, protozoos y plantas superiores), también denominada DOXP, debido a la formación de 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato en la primera etapa de la vía como producto de la condensación de gliceraldehído-3-fosfato y piruvato. Esta es la vía que opera en *Haematococcus pluvialis* y no hay evidencias de una ruta citosólica a partir de acetato y mevalonato (Lichtenthaler et al. 1997). En la Figura 7 se muestra con detalle la ruta de biosíntesis de astaxantina en esta microalga.

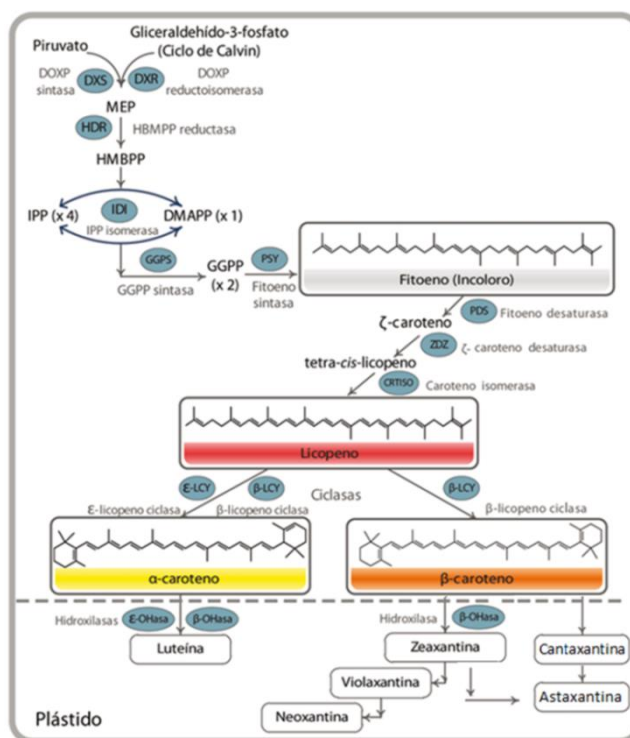


Figura 7. Síntesis de astaxantina en el cloroplasto. Abreviaturas: DOXP: 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato, MEP: 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato, HMBPP: hidroximetil butenil difosfato, IPP: isopentenil difosfato, DMAPP: dimetilalil difosfato, GGPP: geranil geranil pirofosfato. Fuente: modificada de Chacón Ordóñez y Esquivel Rodríguez 2013.



El IPP derivado de la vía DOXP es la molécula inicial de la síntesis de astaxantina. En la etapa siguiente, el IPP experimenta isomerización en dimetilalil difosfato (DMAPP) catalizada por la enzima isopentenil pirofosfato isomerasa (IPI). La elongación de la cadena isoprenoide se inicia con una molécula de DMAPP y una adición lineal subsiguiente de tres moléculas de IPP catalizadas por la enzima geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPS). El paso final de este proceso es la formación de un compuesto de 20 átomos de carbono, pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP), un precursor compartido con otros isoprenoides. El primer paso específico y crucial de la ruta de síntesis de los carotenoides es la formación de fitoeno (40 átomos de carbono), por condensación de dos moléculas de GGPP. Mediante cuatro desaturaciones, catalizadas por dos desaturasas de fitoeno (PDS) y una ζ -caroteno desaturasa (ZDS), el fitoeno se convierte en licopeno, proceso que tiene lugar en el cloroplasto (Grünwald et al. 2000). A continuación ocurren pasos de ciclación catalizados por licopeno-ciclasas (LCY-e y LCY-b), punto de ramificación de la biosíntesis de carotenoides en la mayoría de los organismos, produciendo α -caroteno (precursor de la luteína) y β -caroteno (precursor de otros carotenoides incluyendo astaxantina). En condiciones de estrés, en *Haematococcus pluvialis* la gran mayoría del flujo de carbono se dirige hacia la síntesis de β -caroteno y posteriormente astaxantina. Las dos etapas finales de oxigenación e hidroxilación están catalizadas por β -caroteno cetolasa (BKT) e hidroxilasa (CrtR-b), y son limitantes de la velocidad de la síntesis de astaxantina (Shah et al. 2016). Mientras que parece claro que la síntesis de β -caroteno ocurre en el cloroplasto, existen controversias sobre dónde tiene lugar la síntesis y posterior esterificación de la astaxantina. Algunos autores postulan que ocurre en el retículo endoplasmático (Chen et al. 2015), mientras que otros afirman que puede ocurrir en las vesículas lipídicas, donde se almacenan (Grünwald et al. 2001). En *Haematococcus pluvialis*, el 95 % de las moléculas de astaxantina están esterificadas con ácidos grasos, siendo el ácido oleico el más frecuente. Se ha descrito una correlación lineal entre el contenido de ácidos grasos y el contenido de astaxantina, lo que ha llevado a la hipótesis de que la biosíntesis de astaxantina y la de ácidos grasos están acopladas en este organismo (Boussiba 2000; Recht et al. 2014; Solovchenko 2015). Esta hipótesis

está apoyada además por el hecho de que, con la adición del inhibidor de la síntesis de ácidos grasos cerulenina, o del inhibidor de la síntesis de carotenoides norflurazon, tanto la biosíntesis de astaxantina como la de ácidos grasos se suprimen (Han et al. 2013; Zhekisheva et al. 2002).

1.4.3 CONDICIONES QUE PROMUEVEN LA ACUMULACIÓN DE ASTAXANTINA

El crecimiento y la carotenogénesis de *Haematococcus pluvialis* está regulada por factores ambientales (Han et al. 2013). La privación de algunos nutrientes como el sulfato, fosfato o el nitrato, alta irradiancia y alta temperatura promueven la acumulación masiva de este pigmento acompañada de cambios morfológicos desde un estado vegetativo verde hasta un estado rojo de alta acumulación de astaxantina (Borowitzka et al. 1991; Boussiba et al. 1992; 1999; Solovchenko 2015). Del mismo modo, la adición de NaCl, sulfato de hierro y acetato sódico al medio de cultivo (Cordero et al. 1996) o la presencia de iones metálicos Fe^{2+} , Mn^{2+} y Cd^{2+} (Han et al. 2013) favorecen la carotenogénesis.

El acetato constituye una importante fuente de carbono para esta microalga, promoviendo su crecimiento y la acumulación de astaxantina, debido a que se genera una situación de moderada limitación nitrogenada al aumentar la relación C/N (Kakizono et al. 1992; Kobayashi et al. 1991). Esta forma de inducir la acumulación de astaxantina genera problemas de contaminación.

Tradicionalmente, se ha descrito a la alta irradiancia como un factor principal que desencadena la acumulación de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* (Boussiba et al. 1992; Boussiba y Vonshak 1991; Borowitzka et al. 1991; Kobayashi et al. 1992; Lv et al. 2016; Wang et al. 2003). Sin embargo, no está establecido si es un efecto directo o indirecto, relacionado con la acción positiva de la luz sobre el crecimiento del cultivo y el consiguiente consumo de nutrientes críticos como el nitrato, que podrían favorecer la entrada en limitación nutricional potenciando la acumulación de astaxantina (Fábregas et al. 2003; Guerrero et al. 1981).



El efecto conjunto de la disponibilidad de luz y de nitrógeno sería el responsable de la inducción de la biosíntesis de astaxantina en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis* (Del Río 2007). La disponibilidad real de nitrógeno para la célula está determinada por la concentración de nitrato en el medio, la biomasa del cultivo y la geometría del reactor, definiéndose el término *suministro específico de nitrato* (SEN) como parámetro que engloba las tres variables, que podría ser el factor primario que desencadenaría la acumulación de astaxantina y no sólo la alta irradiancia (Boussiba et al. 1992), de forma que, cuando el valor del SEN se redujese por debajo de un valor umbral, se produciría la acumulación de astaxantina, condición en la que el incremento de la irradiancia potenciaría la acumulación del pigmento (Del Río et al. 2008).

1.4.4 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE ASTAXANTINA

La astaxantina se está produciendo comercialmente a partir de cultivos de *Haematococcus pluvialis* sometidos a diferentes condiciones de estrés, como alta irradiancia, privación de nutrientes o elevada temperatura (Olaizola 2003). Pero el cultivo masivo de *Haematococcus pluvialis* presenta importantes limitaciones (Cysewski and Lorenz 2004), relacionados con su sensibilidad a daños hidrodinámicos y susceptibilidad a la contaminación, en particular por hongos quítridos (*Paraphysoderma sedebokerensis*) (Carney and Lane 2014; Gutman et al. 2009; Han et al. 2013).

A escala industrial, *Haematococcus pluvialis* se está cultivando en sistemas de dos fases (Figura 8). En la primera etapa o “etapa verde” se promueve el crecimiento del organismo en condiciones controladas (habitualmente en sistemas cerrados) para obtener una elevada productividad en biomasa. En una segunda etapa o “etapa roja” (en sistemas abiertos) el cultivo generado en la primera etapa se somete a un estrés nutricional y/o ambiental (deficiencia de nitrato y fosfato, incremento de luz y temperatura, adición de NaCl...) que desencadena la producción de quistes que contienen hasta el 4 % de su peso seco en astaxantina (Figura 9).

Posteriormente, los quistes se rompen para poder extraer el pigmento. Los costes derivados del proceso de cultivo de la microalga así como la extracción de astaxantina de los quistes, hace que el producto en el mercado no sea económicamente competitivo respecto a la que se obtiene mediante otros procesos alternativos, como la de síntesis química (Guerin et al. 2003; Fábregas et al. 2001; Lorenz and Cysewski 2000), justificándose esta industria por las cualidades del producto obtenido a partir de *Haematococcus pluvialis*.

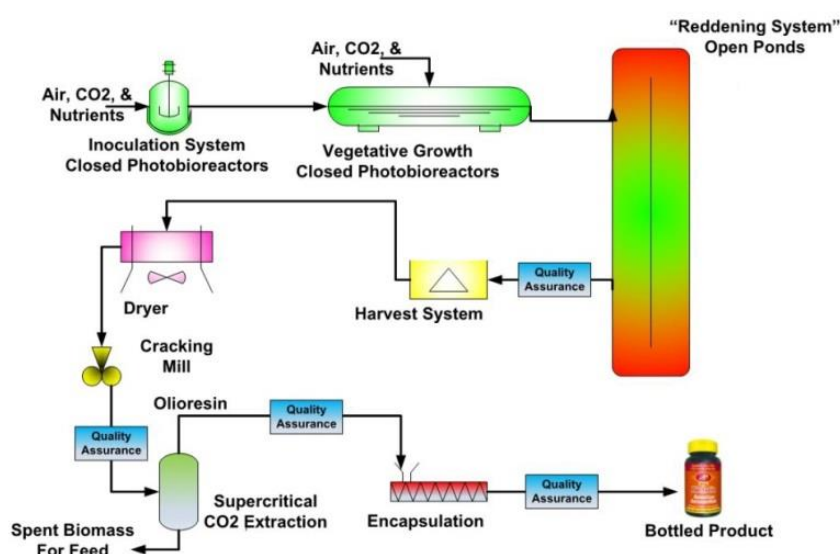


Figura 8. Diagrama de flujo del proceso de producción de astaxantina natural a partir de *Haematococcus pluvialis*. Fuente: Cyanotech (www.cyanotech.com/astaxanthin/astaxanthin-process/).



Figura 9. Cultivo masivo de *Haematococcus pluvialis* para producir astaxantina mediante el sistema en dos etapas en un estanque abierto. Fuente: Cyanotech (www.cyanotech.com/astaxanthin/astaxanthin-process/).

Se han propuesto otra estrategia para producir astaxantina de *Haematococcus pluvialis* (Del Río et al. 2005; 2007; García-Malea et al. 2008; 2009) utilizando cultivos continuos en una fase donde se promueve la acumulación del pigmento simultáneamente con el crecimiento de la microalga ajustando la disponibilidad de nitrógeno. Una de las ventajas de este procedimiento es que en estos cultivos la biomasa está compuesta mayoritariamente por células palmeloides en vez de quistes, facilitando el proceso de extracción del pigmento. Además no se necesitan dos reactores diferentes ni el trasvase de grandes volúmenes de cultivo entre ellos, lo que podría disminuir costos de producción. Esta aproximación se ha realizado a escala de laboratorio y en régimen de iluminación continua, obteniéndose productividades de astaxantina de $20,8 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Del Río et al. 2008). La viabilidad técnica del cultivo en una fase se ha verificado a pequeña escala en el exterior, utilizando reactores tubulares cerrados de 50 litros, alcanzándose productividades de astaxantina de $8 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (García-Malea et al. 2009), comparables a las descritas en el sistema de dos fases ($10 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (Aflalo et al. 2007).

Actualmente, la producción industrial de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis* es una realidad y existen diversas compañías que la

comercializan: *Cyanotech Corporation*, *Fuji Chemicals* y *Mera Pharmaceuticals* cultivan *Haematococcus pluvialis* a la intemperie utilizando el sistema en dos fases. *Cyanotech*, la mayor productora, en sus instalaciones en Hawái, utiliza tanto fotobiorreactores cerrados de doble canal (llamados *Phytodome*, de 28.000 litros de capacidad) como estanques abiertos para producir biomasa verde, que luego se utiliza para inocular otros estanques abiertos en los que se induce la síntesis de astaxantina. Actualmente comercializa su producto BioAstin® (<https://www.nutrex-hawaii.com/pages/bioastin>). *Mera Pharmaceuticals*, también localizada en Hawái, utiliza fotobiorreactores tubulares de tipo serpentín de 25.000 litros de capacidad para producir la biomasa verde y estanques abiertos para la inducción, generando su producto comercial llamado AstaFactor® (<http://nelha.hawaii.gov/our-clients/mera-pharmaceuticals-inc/>). *Algotech*, una de las principales compañías de biotecnología y líder mundial en el cultivo de microalgas y producción de astaxantina, emplea fotobiorreactores tubulares para las dos fases en sus instalaciones en el desierto de Negev (Israel). En mayo de 2017, se asoció con la empresa *Lycored* para distribuir su producto AstaPure® en forma de perlas (<http://www.lycored.com/astaxanthin/>). La compañía japonesa *Fuji Chemicals* con instalaciones en Suiza y en Hawái, utiliza reactores en forma de cúpula llamados *BioDome*TM de 140 litros de capacidad y transparentes para captar la luz solar. La biomasa verde producida en la primera fase se usa para inocular otros *BioDomes*TM donde se induce la carotenogénesis (Breithaupt 2007; Olaizola 2014). Esta empresa comercializa astaxantina natural con su producto AstaReal® en diferentes formatos: cápsulas de gelatina blanda con extracto de aceite para aplicaciones cosméticas, cápsulas con polvo de astaxantina como suplemento alimenticio en forma soluble para bebidas energéticas (<http://www.astareal.com/>).

1.5 METABOLÓMICA

La metabolómica es la técnica y estudio de los metabolitos o moléculas pequeñas que constituyen rutas bioquímicas. Permite establecer el perfil de los metabolitos de una muestra biológica. En la última década, se ha aplicado en diversos



estudios microbiológicos y se ha instaurado como una metodología clave para el análisis cualitativo y cuantitativo de metabolitos, debido a su extraordinaria sensibilidad, bajo consumo de muestras y alta selectividad constituyendo una herramienta valiosa para el análisis del metabolismo celular y de las respuestas a los factores ambientales (Su et al. 2014). Además, la metabolómica incluye en su objetivo el estudio de las variaciones dinámicas y las implicaciones bioquímicas de los metabolitos. Para el desarrollo de un estudio metabolómico es importante disponer de conjuntos de datos reproducibles, fiables y homogéneos. En este sentido, la aplicación del cultivo continuo a este tipo de estudios ofrece una buena alternativa a los sistemas en estanco, donde las diferencias metabólicas pueden quedar enmascaradas por cambios en el contenido y composición de la biomasa que acontecen al evolucionar el cultivo (Hoskisson and Hobbs 2005). El cultivo continuo permite a las células adaptar su velocidad de crecimiento a la velocidad de dilución impuesta, alcanzándose situaciones estabilizadas (estados estacionarios), en las que se mantienen constantes los parámetros de cultivo (incluida la disponibilidad de luz y nutrientes), así como la concentración y composición de la biomasa generada (Pirt 1980). Este régimen de operación permite estudiar la influencia de cada uno de los parámetros que afectan al cultivo de forma individualizada y analizar su influencia sobre el crecimiento o contenido en un compuesto de interés.

Para el análisis simultáneo de multitud de metabolitos se aplican herramientas como la RMN y la MS, si bien la cromatografía de gases-masas (GS-MS) es el método más extendido. La combinación de altas resoluciones, sensibilidad y tiempos de análisis razonables de la cromatografía, junto con la capacidad de la espectrometría de masas de identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, dan lugar a una combinación ideal para la determinación de metabolitos. Por ejemplo, esta técnica se ha utilizado en el estudio de los intermediarios del ciclo TCA en organismos modelo como *Chlamydomonas reinhardtii* (Veyel et al. 2014) estableciendo la importancia de la toma de muestras y parada el metabolismo en el perfil metabólico obtenido, o en *Arabidopsis*, donde se ha aplicado al estudio de las

modificaciones en el perfil metabolómico como respuesta a la limitación de nitrato (Tschoep et al. 2009).

En la actualidad, el enfoque metabolómico se está aplicando en microalgas para estudiar la respuesta a cambios en las condiciones ambientales, proporcionando una “instantánea” del estado metabólico de la microalga en una situación determinada. Por ejemplo, ha permitido estudiar los cambios de metabolitos de *Chlamydomonas reinhardtii* bajo privación de nutrientes en cultivos estancos (Lee et al. 2012; Wienkoop et al. 2010) y cultivos semicontinuos (Veyel et al. 2014; Willamme et al. 2015), o la caracterización metabolómica de dos Clorofíceas, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*, y dos cianobacterias, *Aphanothece microscopica* y *Phormidium autumnale* (Vendruscolo et al. 2018). En el caso de *Haematococcus pluviialis*, se ha aplicado al estudio del perfil metabolómico de cultivos en estanco, comparando células verdes con quistes (Recht et al. 2014). En condiciones de hambre de nitrógeno y alta luz, durante 48 horas, la microalga incrementaba la actividad del ciclo TCA aumentando los niveles de succinato, fumarato y malato, lo que podría estar relacionado con la biosíntesis de ácidos grasos, que ocurría simultáneamente con la síntesis de astaxantina. Este estudio ha permitido proponer un modelo integrador de la respuesta de *Haematococcus pluviialis* en estas condiciones de cultivo, relacionando la degradación de almidón con la síntesis de ácidos grasos en las últimas fases de la respuesta al estrés.

Esta metodología también se ha aplicado para el estudio de la redistribución del carbono fijado por *Haematococcus pluviialis* destinado a la formación de distintos compuestos de reserva, en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo generando una importante información de aplicación biotecnológica para la producción de metabolitos con interés comercial, como por ejemplo los carotenoides (Zhekisheva et al. 2002).

La mayoría de los estudios metabolómicos con *Haematococcus pluviialis* en relación a la acumulación de astaxantina están realizados en régimen estanco y comparando quistes con células vegetativas (Lv et al. 2016; Recht et al. 2014; Su et al.



2014; Zhekisheva et al. 2002). En la operación en estanco, a medida que el cultivo evoluciona, se modifican parámetros clave como la disponibilidad de nutrientes o de luz, debido al propio crecimiento del cultivo que afectan a su perfil metabólico. Es decir, un cultivo estanco cambia con el tiempo, lo que repercute en cambios en la morfología celular, en la expresión de genes y en la acumulación o pérdida de metabolitos. Todas estas modificaciones dificultan relacionar un proceso concreto (como la biosíntesis de astaxantina) con cambios en algún metabolito específico.

Por otro lado, al analizar el perfil metabólico en quistes, el número de metabolitos modificados es muy elevado porque múltiples procesos se ven alterados en este tipo de células. De ahí el interés de realizar el estudio de los metabolitos relacionados con la síntesis de astaxantina utilizando cultivos continuos y comparando células vegetativas sin acumulación de pigmento con células donde el proceso se esté iniciando, sin que hayan ocurrido cambios a nivel morfológico o fisiológico drásticos que dificulten su interpretación y que se mantengan estables durante el tiempo de experimentación, sin derivar en la formación de quistes.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es conocer la situación bioquímica de células de *Haematococcus pluvialis* en las etapas iniciales de acumulación de astaxantina, para identificar los metabolitos que primariamente están afectados cuando se induce la síntesis del pigmento mediante una limitación moderada de nitrógeno. Para alcanzar este objetivo, es necesario disponer de cultivos morfológicamente homogéneos de células que acumulen astaxantina y crezcan activamente en cultivo continuo.

Para su consecución se necesario abordan los siguientes objetivos específicos:

- Obtener cultivos homogéneos y estables con distinto grado de acumulación de astaxantina.
- Caracterizar metabólica y morfológicamente estos cultivos durante un ciclo solar simulado (en luz y en oscuridad).

MATERIALES Y MÉTODOS



2.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

El organismo utilizado ha sido la microalga *Haematococcus pluvialis* CCAP 34/8 procedente de Culture Collection of Algae and Protozoa, Centre for Hydrology and Ecology, Ambleside (Reino Unido). Para su cultivo, se utilizó el medio descrito por BioProcess y comunicado por Nils Norsker, modificado para eliminar cualquier fuente orgánica de carbono. Para la preparación del medio se partió de soluciones concentradas de macronutrientes y metales traza (sustrato inorgánico), fosfato y vitaminas en agua destilada.

Tabla 1. Composición del sustrato inorgánico.

Sustrato inorgánico	1 litro
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4,90 g
FeNa EDTA	0,45 g
EDTA-Na ₂	0,45 g
H ₃ BO ₃	1,00 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,28 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	3,50 g
Solución de metales traza	0,8 ml

Tabla 2. Composición de la solución de metales traza.

Solución de metales traza	100 ml
ZnCl ₂	0,525 g
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,500 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,225 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,500 g

El pH de estas soluciones se ajustó a 3-4 con HCl, manteniéndose en oscuridad a temperatura ambiente. La solución de sustrato inorgánico preparada según se indica en la Tabla 1, se esterilizó en autoclave a 121°C y 1 atmósfera durante 20 minutos.

Tabla 3. Composición de la solución de vitaminas.

Solución de vitaminas	100 ml
Biotina	0,020 g
B ₁	0,100 g
B ₁₂	0,005 g

El agua para preparar la solución de biotina debía estar a 80 °C para facilitar su disolución. Una vez fría, se añadió B₁ y B₁₂, ajustando el pH a 5 y se completó con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml (Tabla 3). La solución final se esterilizó por filtración mediante unidades de filtración estériles (VWR 514-0296, 0,2 µm Ø) en campana de flujo laminar (TELSTAR MH100), y se guardó en oscuridad a 4 °C. La solución de KH₂PO₄ (1M) se esterilizó separadamente para evitar su precipitación. Además, de forma independiente, se preparó una solución de NaNO₃ (2 M) estéril para suplementar el Medio Inorgánico con la concentración requerida en cada experimento.

La preparación del medio final se realizó en ambiente estéril, en campana de flujo laminar. Para ello, se añadió a un litro de agua destilada previamente esterilizada en autoclave, 10 ml de solución de sustrato inorgánico, 0,36 ml de KH₂PO₄ (1M), 1 ml de la solución de vitaminas y el volumen necesario de NaNO₃ (2 M) para obtener la concentración deseada en cada experimento. Para evitar la formación de espuma, se añadió 0,3 ml de una solución diluida 1:100 de antiespumante Sigma - Aldrich (St. Louis, USA) por litro de medio, también esterilizada por separado.



La composición final del Medio Inorgánico se recoge en la Tabla 4:

Tabla 4. Composición final del Medio Inorgánico.

Componente	Concentración
KH ₂ PO ₄	0,36 mM
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,20 mM
FeNa EDTA	12 µM
EDTA-Na ₂	12 µM
MnCl ₂ · 4H ₂ O	14 µM
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,24 mM
H ₃ BO ₃	0,16 mM
ZnCl ₂	0,31 µM
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,17 µM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	15 nM
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,16 µM
Biotina	0,82 µM
B ₁	3,77 µM
B ₁₂	0,04 µM

Para el cultivo en régimen continuo se utilizó el medio indicado, pero conteniendo doble concentración de cada uno de los componentes (Medio Inorgánico 2x), como se justifica en el apartado 3.1 de Resultados.

La conservación y mantenimiento de la estirpe en condiciones de esterilidad se efectuó en tubos de agar inclinado, conteniendo medio sólido, preparado a partir del medio líquido descrito y suplementado con BACTOAGAR-DIFCO al 1,5% (p/v). Los tubos se mantuvieron a 25°C y a irradiancia inferior a 75 µE m⁻² s⁻¹. Se realizaron resiembras periódicamente.

2.2 CULTIVO ESTANCO EN CÁMARA TERMOSTATIZADA

Se desarrolló en condiciones fotoautotóficas en cámaras de cultivo con temperatura controlada de 25 °C, adecuada para el crecimiento de *Haematococcus*

pluvialis. Se emplearon tubos cilíndricos de base cónica de 4,5 cm de diámetro y 200 ml de capacidad, conteniendo un volumen de cultivo estéril de 150 ml. Estos tubos se taparon con algodón hidrófobo atravesado por una varilla de vidrio hueca, cuyo extremo inferior llegaba al fondo del recipiente y por su extremo superior se prolongaba con la unión a una tubería de silicona por la que se suministraba la mezcla gaseosa de aire suplementado con CO₂ al 1% (v/v) filtrada mediante un filtro Millipore de 0,2 µm Ø para mantener la esterilidad. Estos cultivos se iluminaron con una batería de tubos fluorescentes (daylight-20W PHILIPS), que proporcionaban al cultivo una irradiancia incidente de 75 µE m⁻² s⁻¹ aproximadamente (Figura 10).

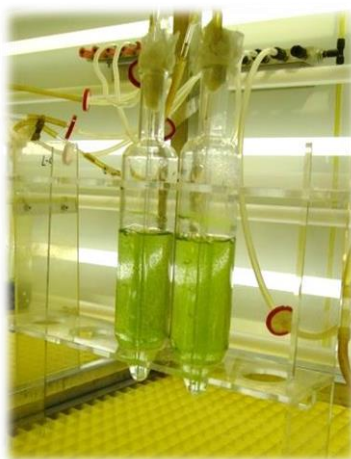


Figura 10. Cultivo estanco en cámara climatizada.

Este sistema de cultivo se empleó para generar los inóculos necesarios para iniciar las distintas experiencias en cultivo continuo.

2.3 CULTIVO CONTINUO EN FOTOQUIMIOSTATO

Los ensayos se realizaron en seis reactores tipo columna de burbujeo (Figura 11), de 1,8 L de capacidad, con las dimensiones mostradas en el esquema de la Figura 12 provistos de doble pared, con camisa de termostatización, por la que se hacía circular agua procedente de un baño circulador refrigerador (Julabo, modelo F12) que mantenía la temperatura de cultivo a 25°C. El diseño incluía un rebosadero para la

operación en modo continuo y un orificio para el alojamiento de la sonda de pH. La parte superior cerraba con un tapón con orificios para tres varillas de vidrio de 4 mm de diámetro interno: entrada de medio fresco, toma de muestra y salida de aire. Salvo la varilla para salida de aire, que no llegaba al nivel del cultivo, las otras dos alcanzaban como mínimo la mitad del reactor, para asegurar la adecuada incorporación de medio fresco, así como la representatividad de las muestras extraídas al cultivo.



Figura 11. Instalación de reactores tipo columna de burbujeo.

La entrada de gases se realizaba por la parte inferior, a través de una tubería bifurcada de silicona de 5 mm de diámetro interno, que atravesaba el tapón. Esta aireación aseguraba la homogeneización del cultivo. El caudal de aire se regulaba a $16,7 \text{ L de aire} \cdot \text{litro de cultivo}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, mediante rotámetro. Para el control de pH, el reactor disponía de un electrodo combinado (Crison, modelo 4400/120), conectado a un medidor-controlador de pH (Crison, modelo pH 214/220-R1) que mantenía el intervalo de consigna establecido (entre 7,0 y 7,05). El controlador actuaba sobre una electroválvula, (M&M international 7700) que abría el paso de CO_2 puro cuando el pH subía de 7,05, que se mezclaba con el flujo de aire, hasta restablecer el pH 7,0.

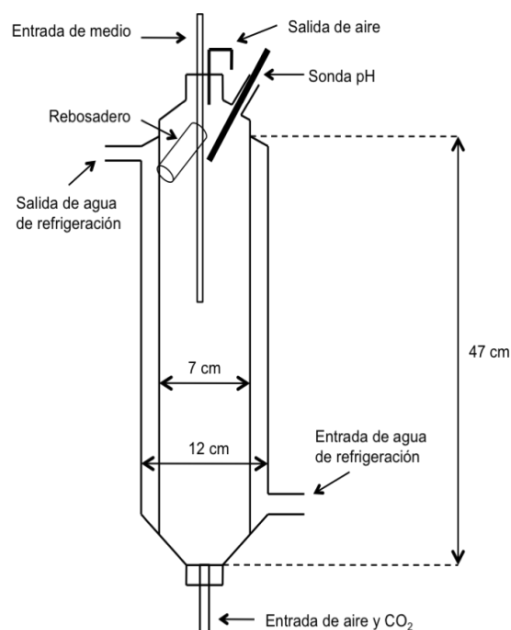


Figura 12. Esquema del reactor tipo columna de burbujeo.

Los reactores y las sondas de pH se esterilizaron en autoclave, a 121°C y 1 atmósfera durante 20 minutos.

Para la operación en continuo se utilizaron bombas peristálticas (P-1 PHARMACIA) que permitían regular la entrada de medio fresco a distinta velocidad sólo durante el periodo de iluminación.

Los reactores se iluminaron durante 12 horas con tubos fluorescentes de potencia regulable mediante reostatos, controlados por una aplicación informática desarrollada por el Dpto. de Ingeniería Química de la Universidad de Almería (*DAQ Factory 5.0*). Esta aplicación permitía modificar la irradiancia, simulando un ciclo circadiano, variando desde 0 hasta el nivel máximo establecido en cada experimento. Cada reactor se iluminaba con 6 tubos fluorescentes de luz blanca de 50 cm (Phillips Master TL5 HO 24 W/840 white-light lamp), que lo rodeaban completamente, agrupados de dos en dos, sobre tres paneles (Figura 13). Este sistema proporcionaba una iluminación con un valor máximo de $2500 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

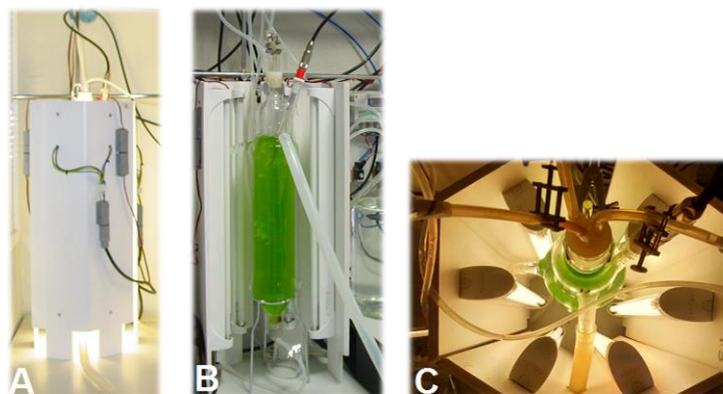


Figura 13. Vista frontal del sistema de iluminación (A y B) y vista superior (C) de la disposición de los fluorescentes sobre los paneles. Fuente: Del Río et al. 2017.

Los reactores se inocularon en condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar, añadiendo 100 ml de inóculo, completando hasta 1,8 L con Medio Inorgánico estéril con la concentración de nitrato requerida en cada situación experimental. Se dejaron crecer en estanco durante 4-5 días, incrementando la irradiancia durante este tiempo de forma gradual hasta llegar al nivel seleccionado para cada experiencia. En ese momento se pasó a la operación en continuo.

Las muestras se recogían cada 24 horas, en situaciones estabilizadas, denominadas “estados estacionarios dinámicos” (o de equilibrio fluido). Para la determinación de los distintos componentes celulares, se tomaron 2 muestras de días consecutivos y se analizaron por duplicado.

2.4 MÉTODOS Y DETERMINACIONES ANALÍTICAS

2.4.1 DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR PESO SECO

La valoración de la biomasa presente en el cultivo se realizó determinando peso seco. Se emplearon filtros de microfibra de vidrio Whatman GF/C de 1,2 μm de \varnothing de poro, secados previamente a 80°C durante al menos 24 h. Posteriormente, se pasaron a un desecador durante 60-120 minutos, para que adquiriesen la temperatura

ambiente, evitando la rehidratación, pesándose a continuación en una balanza de precisión.

Se filtraron de 5 a 10 ml del cultivo (según su concentración) lavándose las células retenidas con un volumen igual de agua destilada. Los filtros conteniendo las células se secaron a 80°C durante 24 h, se pasaron por el desecador y se pesaron en una balanza de precisión. El peso seco se determinó por diferencia de pesada del filtro con y sin células y se refirió al volumen filtrado, en gramos de biomasa por litro de cultivo (Fontes et al. 1987).

2.4.2 LIOFILIZACIÓN DE LA BIOMASA

Para las determinaciones analíticas se utilizó biomasa liofilizada. Se recogieron las muestras siguiendo el método de parada del metabolismo celular “quenching” (Veyel et al. 2014). Para ello, se tomaron 100 ml de muestra, se centrifugaron rápidamente en frío (1 minuto, 3645 x g), y lavaron con el mismo volumen de agua destilada para eliminar las sales del medio. El sedimento resultante de la centrifugación se congeló en nitrógeno líquido y deshidrató mediante liofilización (Skadi-Europe® TFD 8503) durante al menos 2 días.

Para su almacenamiento, las muestras se gasearon con corriente de nitrógeno, para prevenir la oxidación, y guardaron a -20° C.

2.4.3 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA

2.4.3.1 Determinación de carotenoides.

La extracción de pigmentos y posterior saponificación se realizó según el método descrito por Del Campo et al. 2004. Todo el proceso se llevó a cabo en oscuridad para evitar la degradación de los pigmentos.

Se partió de 4 mg de biomasa liofilizada sometida a rotura mecánica en MiniBead Beater (Biospec Products), con perlas de vidrio (2,7 mm Ø), utilizando



acetona como solvente. Se realizaron los lavados necesarios hasta que el sobrenadante quedase sin color. Los sobrenadantes se unieron y se secaron con corriente de nitrógeno.

Para cuantificar la astaxantina que se encontraba esterificada con ácidos grasos, se procedió a la hidrólisis de estos ésteres. Para ello, se resuspendió el extracto de carotenoides en 1 ml de éter, se añadió 1 ml de KOH al 2% en metanol y se dejó reposar 15 minutos a 0°C (en baño de hielo). Transcurrido este tiempo, se adicionaron 2 ml de una solución de NaCl al 10 % en agua, se agitó fuertemente y centrifugó (1 minuto, 3000 x g). Se retiró y guardó la capa superior (éter con pigmentos). Para asegurar la extracción total, a la fase acuosa restante se adicionó 1 ml de éter, se agitó fuertemente y se centrifugó, retirando la capa superior (éter con pigmentos) que se unió a la anterior. Se descartó la capa acuosa.

La fracción de éter con pigmento se lavó tres veces para eliminar el KOH restante. Para ello, se le añadió 2 ml de NaCl al 10% en agua, agitando fuertemente, centrifugando y descartando la capa acuosa inferior. Se volvieron a añadir 2 ml de NaCl al 10% en agua, se agitó fuertemente y se centrifugó, descartando y guardando la capa superior (éter con pigmentos). Finalmente, se realizó un último lavado, añadiendo 1 ml de éter a la capa acuosa, agitando fuertemente y centrifugando, descartando la fase inferior acuosa y reuniendo todas las fracciones conteniendo éter con pigmentos, que se llevó a sequedad bajo nitrógeno.

Para el análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución, se adicionó 1 ml de acetona, se agitó hasta resuspender completamente el secado, se centrifugó y recogió el sobrenadante. Alícuotas de 10 µl se inyectaron en HPLC (Waters™ LC Module I Plus), utilizando una columna “Nova-Pack” C-18 de fase reversa de 3,9 x 150 mm, con un tamaño de partícula de 4 µm y tamaño de poro de 60 Å, conteniendo dimetiloctadecilsilil unido a sílice amorfa.

Como fase móvil se emplearon solvente A: metanol-agua-tampón (8:1:1, v/v); y solvente B: metanol-acetona (1:1, v/v). El tampón estaba formado por una solución de acetato de tetrabutilamonio (0,05 M) y acetato de amonio (1 M) en agua. Los pigmentos se eluyeron a un flujo de 1 ml min⁻¹, utilizando el gradiente especificado en

Mínguez-Mosquera et al. 1992. El detector utilizado fue “Photodiode Array Waters 2996” que realizó un barrido de absorbancias entre 360 y 700 nm, seleccionando el cromatograma a una longitud de 440 nm. Para la cuantificación, se calibró el sistema con patrones de astaxantina, cantaxantina, β -caroteno, α -caroteno, luteína, violaxantina, zeaxantina y licopeno (DHI Water & Environment España).

2.4.3.2 Determinación de ácidos orgánicos mediante CG-MS.

Los ácidos orgánicos se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS) (Veyel et al. 2014).

2.4.3.2.1 *Calibrado*

Se prepararon 11 patrones que contenían una mezcla de ácidos oxaloacético, pirúvico, succínico, fumárico, málico, α -cetoglutarico y cítrico (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA) diluidos en piridina, a distintas concentraciones: 2, 8, 15, 25, 30, 40, 100, 200, 400, 600, 800 μ M, usando ribitol (Sigma-Aldrich) 40 μ M como patrón interno.

2.4.3.2.2 *Preparación de muestras*

Para la extracción de los ácidos orgánicos, 20 mg de biomasa liofilizada se sometieron a rotura mecánica en MiniBead Beater (Biospec Products), utilizando como solvente 3 ml de una mezcla de metanol:cloroformo:agua (MCW) en proporción 5:2:1 a la que se añadía 5 μ l de ribitol (4 mM preparado en metanol). Se realizaron los lavados necesarios hasta que el sobrenadante quedase sin color. Todos los sobrenadantes unidos se secaron bajo corriente de nitrógeno y guardados a -20°C hasta su derivatización y posterior análisis (Figura 14).

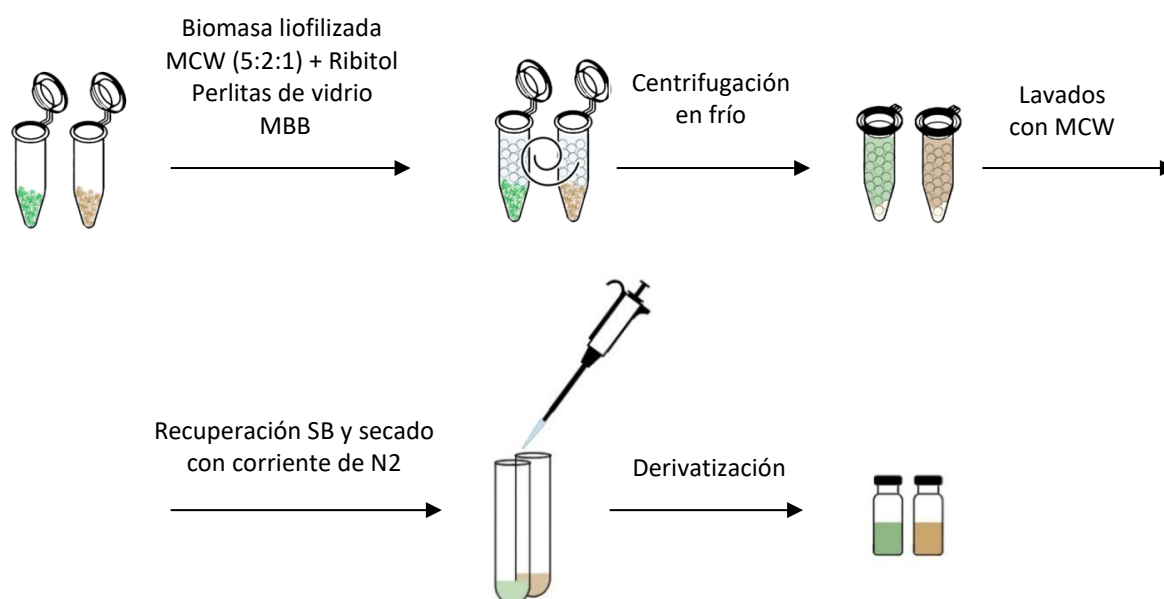


Figura 14. Esquema de la preparación de los extractos de *Haematococcus pluvialis* para el análisis de ácidos orgánicos mediante CG-MS. MCW: metanol-cloroformo-agua; MBB: Mini Bead Beater; SB: sobrenadante.

2.4.3.2.3 Derivatización

Los extractos se derivatizaron según la técnica de dos etapas (Roessner 2001) basada en una sililación de los compuestos con los agentes derivatizantes metoxamina (MTX) y N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) (Sigma-Aldrich).

Se resuspendió el extracto en 100 µl de piridina, se trató con 200 µl de MTX (20 mg/ml en piridina) incubando 90 minutos a 37° en agitación. Se añadió 200 µl del segundo agente derivatizante, MSTFA, y se incubó 30 minutos a 37° en agitación. El mismo protocolo se aplicó a cada una de las 11 mezclas de patrones que se habían preparado, tomando 100 µl de cada mezcla. El ribitol en este extracto derivatizado se encontraba a una concentración final de 40 µM. Se inyectó en el cromatógrafo 1 µl de cada muestra derivatizada.

2.4.3.2.4 Cuantificación

La detección de los compuestos se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas simple cuadrupolo GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japón), utilizando una columna capilar MetaX5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m; Teknokroma) acoplada a una pre-columna (Non Polar Guard Column 0,25 mm ID 1 x 10 m).

Dependiendo de la concentración de los ácidos orgánicos, los análisis se llevaron a cabo en modo split 1:20 (1 de cada 20 partes de la muestra entraba en la columna) o en modo splitless (se inyectaba toda la muestra).

Las condiciones establecidas para el análisis de las muestras fueron: temperatura del inyector, de la interfase y de la fuente de iones 300 °C, 250 °C y 200 °C, respectivamente y helio como gas portador (1,84 ml min⁻¹). El programa de temperatura del inyector comenzaba a 80 °C subiendo 20 °C por minuto hasta alcanzar los 300 °C, manteniendo esta temperatura 2 minutos. La ionización de los compuestos se realizó por impacto electrónico con un voltaje de ionización de 70 eV, obteniendo un espectro de masas en el rango de 50–750 m/z para los ácidos oxaloacético, pirúvico, succínico, málico y cítrico (operando en modo *full scan*). Para la detección de los ácidos fumárico y α -cetoglutarico se operó en modo SIM y se seleccionó el ión 73 para ambos, monitorizándolos sólo en los intervalos de tiempo de retención correspondientes, 6,30 – 6,50 y 7,70 – 7,90 minutos, respectivamente. Para el ribitol, se seleccionó el ion 204 monitorizándolo en el intervalo de tiempo 8,58 – 8,80 minutos.

El análisis cualitativo se realizó mediante el software *CGMS Solution 2.30 Mass spectra* comparando los tiempos de retención y los espectros de masas obtenidos con las librerías Wiley 229 y NIST11. El análisis cuantitativo (Ecuación 1) se realizó mediante las curvas de calibrado preparadas con los patrones, comparando las áreas de cada uno de los picos normalizadas frente al área del ribitol y refiriéndolo a la biomasa total analizada.



Ecuación 1

$$\text{Ac. orgánico (nanomoles} \cdot \text{mg}^{-1}) = \frac{(\text{ácido orgánico (}\mu\text{M)}) \cdot \text{Vol muestra (}\mu\text{l)}}{\text{Biomasa liofilizada (mg)} \cdot 1000}$$

2.4.3.3 Determinación de ácidos orgánicos mediante HPLC.

2.4.3.3.1 Preparación de muestras

La rotura mecánica de la muestra se realizó en MiniBead Beater, con 10 mg de biomasa liofilizada, perlas de vidrio (2,7 mm \varnothing) y ácido perclórico (0,4 M) en 5 pases de 1 minuto, alternando otro minuto en hielo para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. Posteriormente se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Se centrifugaron (1 minuto, 12100 x g) y se recuperó el sobrenadante. Tras realizar los lavados necesarios con ácido perclórico (0,4 M) hasta que el sobrenadante quedase sin color, el conjunto de todos los sobrenadantes se unieron y se contabilizó el volumen final obtenido.

2.4.3.3.2 Detección

Los ácidos orgánicos así extraídos se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Waters™ LC Module I Plus con detector de fotodiodos Waters 2996) utilizando una columna de intercambio iónico (Aminex HPX-87H 300 mm x 7,8 mm y 9 μm de tamaño de partícula; Bio-Rad Laboratories, Inc.).

El extracto en ácido perclórico se centrifugó (para eliminar restos celulares) y una alícuota de 20 μl del sobrenadante se inyectó en el cromatógrafo. Para la elución isocrática se utilizó H_2SO_4 (5 mM) a una velocidad constante de 0,6 ml/min y una temperatura de operación de 35 °C. La longitud de onda establecida en el fotodetector fue de 210 nm.

El contenido en ácidos orgánicos (mM) se realizó mediante el software *Millennium32* comparando con curvas de calibrado a partir de estándares comerciales

de los mismos ácidos orgánicos analizados por HPLC, tratados de la misma forma que las muestras.

2.4.3.4 Determinación de azúcares mediante CG-MS.

El análisis del contenido en azúcares se realizó mediante cromatografía de gases-masas (CG-MS), siguiendo el método de Veyel et al. (2014). Las muestras se prepararon siguiendo el protocolo de extracción y derivatización utilizado para el análisis de ácidos orgánicos, utilizando una columna capilar VF – 1 ms (25 m; 0,20 mm; 0,33 μ m; Agilent Technologies).

2.4.3.4.1 *Calibrado*

Se prepararon 8 patrones que contenían una mezcla de glucosa, fructosa, maltosa, trehalosa, galactosa, sacarosa, ribosa y ribulosa (Sigma – Aldrich; St. Louis, USA) en agua, a concentraciones de 5, 10, 20, 40, 80, 100, 300, 600 μ M usando ribitol (Sigma-Aldrich) 40 μ M, preparado en metanol, como patrón interno para cuantificar las posibles pérdidas durante el proceso. Los patrones así preparados se llevaron a sequedad con corriente de nitrógeno (Orata 2012b).

2.4.3.4.2 *Cuantificación*

Las condiciones para el análisis de las muestras fueron: temperatura del inyector 300 °C, comenzando a 105 °C, subiendo 8 °C por minuto hasta alcanzar 260 °C, y 20 °C por minuto hasta alcanzar 300 °C manteniéndose esta temperatura 15 minutos. La temperatura de la interfase y de la fuente de iones fue 280 °C y 200 °C respectivamente.

Para la detección se trabajó en modo *splitless*/SIM, seleccionando el ión 73 en todos los casos, y adicionalmente un ion exclusivo de cada azúcar, para asegurar la



identidad del mismo. Además del ión selectivo, se utilizó el tiempo de retención como criterio de identificación. Los iones selectivos se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Iones selectivos para operar en modo SIM.

Compuesto	Iones seleccionados
Glucosa	319
Fructosa	103
Maltosa	204
Trehalosa	361
Ribitol	147
Sacarosa	361
Galactosa	319
Ribosa	103
Ribulosa	103

El análisis cualitativo se realizó con el software *CGMS Solution 2.30 Mass spectra*, comparando los tiempos de retención y los espectros de masas obtenidos con las librerías Wiley 229 y NIST11. El análisis cuantitativo se realizó mediante las curvas de calibrado preparadas con los patrones, comparando las áreas de cada uno de los picos normalizadas frente al área del ribitol y refiriéndolo a la biomasa total analizada (Ecuación 2).

Ecuación 2

$$\text{Azúcar (nanomoles} \cdot \text{mg}^{-1}) = \frac{(\text{azúcar (}\mu\text{M)}) \cdot \text{Vol muestra (}\mu\text{l)}}{\text{Biomasa liofilizada (mg)} \cdot 1000}$$

2.4.3.5 Determinación de ácidos grasos

Para realizar esta determinación, fue necesaria la extracción previa de lípidos, su posterior metilación según el protocolo de Rodríguez-Ruiz et al. 1998 y análisis mediante cromatografía de gases. El contenido se calculó en referencia a un patrón

interno (C19 ácido nonadecanoico, Sigma – Aldrich) preparado al 1% (p/v) en tolueno, añadido previamente a la muestra.

Para la extracción inicial de lípidos totales, se pesó en torno a 10 mg de biomasa liofilizada y se añadió 10 µl del patrón interno. La rotura mecánica de la muestra se realizó en MiniBead Beater con perlas de vidrio (2,7 mm Ø), utilizando como solvente una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v). Se centrifugó (1 minuto, 12100 x g) para separar las perlas de vidrio y se recogió la fase superior en un tubo con tapón roscado. Se realizaron los lavados necesarios con cloroformo/metanol (2:1 v/v) hasta que el sobrenadante quedó sin color. Se descartó el sedimento y todos los sobrenadantes unidos se secaron bajo corriente de N₂.

Sobre este extracto seco se añadieron 2 ml de mezcla metilante (metanol/cloruro de acetilo 20:1 v/v) y 1 ml hexano. Se incubó 20 minutos a 100°C, dejando enfriar posteriormente a temperatura ambiente. Se añadieron 2 ml de agua y se separaron las capas por centrifugación (1 minuto, 1500 x g). Se recogió la fase superior de hexano en vial de cromatografía realizando, si fuese necesario, un nuevo lavado con hexano, recuperando el sobrenadante que se unía al anterior.

Una alícuota de 1 µl se inyectó en el cromatógrafo GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japón) con detector de ionización de llama, empleando una columna SupraWax-280 (15m x 0,10 mm x 0.10 µm) (Teknokroma). Las condiciones para el análisis de las muestras fueron: temperatura del inyector, 220 °C, modo de inyección split 1:20. La temperatura de la columna siguió un gradiente, empezando a 90°C, subiendo 10 °C por minuto hasta alcanzar 160 °C, y después hasta 175 °C a razón de 5 °C por minuto, volviendo a subir 10 °C por minuto hasta alcanzar 220 °C, manteniéndose esa temperatura durante 6 minutos.

Los tiempos de retención de cada ácido graso se establecieron a partir de la calibración previa con una mezcla comercial de ésteres metílicos (Supelco™ 37 Fame mix, no. 47885U, PUFA-3 Matreya LLC, no. 1177). El contenido de ácidos grasos se determinó a partir de la Ecuación 3.



Ecuación 3

$$AG (\% \text{ de biomasa}) = \frac{At - Ap}{Ap} \cdot \frac{Vp \cdot Cp}{Mm} \cdot 100$$

(At=Área total de picos (calculada integrando todos los picos entre el C14 y el C24, excepto el del patrón, C19, y eliminando cualquier pico no reconocido); Ap=Área del patrón; Vp=Volumen patrón (ml); Cp=Concentración patrón (mg ml⁻¹); Mm=Masa muestra (mg))

2.4.3.6 Determinación de aminoácidos libres

La determinación de aminoácidos libres se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Hitachi Ellite Lachrom), utilizando una columna C18 (LichroCART® 125-4, Merck) en fase reversa de 125 mm de longitud, con 5 µm de tamaño de partícula, 125 Å de tamaño de poro y 3 mm Ø interno.

Para la preparación del extracto, se añadió 400 µL de HCl 0,1 N a 20 mg de biomasa liofilizada, incubando en frío durante 1 hora. Posteriormente, se derivatizó con fenil isotiocianato siguiendo el protocolo descrito por Henrikson y Meredith (1984).

La temperatura de la columna fue 46 °C y el volumen de inyección 10 µL. Se utilizaron dos fases móviles: fase A (acetato sódico 70 mM con 2,5% de acetonitrilo) y fase B (acetonitrilo : agua en proporción 1:1) a una velocidad de flujo de 1,5 ml · min⁻¹. El gradiente inicialmente está formado por el 100 % de la fase A hasta los 25 minutos. A partir de ese momento, la fase móvil está compuesta en un 70 % por la fase A y en un 30 % por la fase B, hasta que a los 35 minutos lo constituye en un 100 % la fase B. Esta composición se mantiene hasta los 43 minutos que la fase móvil vuelve a estar compuesta en 100 % por la fase A hasta los 53 minutos que finaliza.

La detección se hizo mediante absorbancia a 254 nm. Para la cuantificación, se calibró el sistema derivatizando patrones comerciales a distintas concentraciones que contenían una mezcla de todos los aminoácidos (AAS18 Sigma - Aldrich, St. Louis, USA)

excepto asparragina, glutamina y triptófano (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA) que se añadían a la mezcla disueltos en HCl (0,1 N).

2.4.3.7 Determinación de composición elemental

Para la determinación de la composición elemental se utilizó un Analizador Elemental (CHNS-O THERMO, modelo FLASH EA 1112 Series).

El análisis se realizó por duplicado, a partir de biomasa liofilizada (entre 0,5 y 1,5 mg) en cápsulas de cuarzo y utilizando como patrones: sulfanilamida, L-Cisteína, DL metionina y BBOT (1,5 Bis (5-tert-butil-benzoxazol-2-il) tiofeno). Los contenidos en N, C, H y O se calcularon en referencia a los patrones y se expresaron como porcentaje de la biomasa (Del Río 2007).

2.4.3.8 Determinación de parámetros fotosintéticos

Para estudiar los parámetros fotoquímicos, se utilizó la técnica de fluorescencia de pulsos de amplitud modulada (PAM) utilizando distintas fuentes de luz: luz roja modulada de baja intensidad, pulsos de luz actínica de alta intensidad, luz actínica blanca continua y luz del rojo lejano, empleando un Dual-PAM-100 (Walz, Effeltrich, Germany). Las muestras se incubaron en oscuridad durante 15 minutos para que todos los centros de reacción y el *pool* de plastoquinonas quedasen oxidados (abiertos) (F_0). La muestra se agitó a temperatura ambiente, aplicando un pulso de luz saturante actínica roja ($10.000 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$) de 300 ms de duración para excitar la clorofila y cerrar así sus centros de reacción y obtener la fluorescencia máxima (F_M). La diferencia entre F_0 y F_M se denomina fluorescencia variable F_v , ($F_v = F_M - F_0$) y la relación entre la fluorescencia variable (F_v) y la fluorescencia máxima (F_M) es la estimación del máximo rendimiento cuántico del PSII (Ecuación 4). Cuando a la muestra se iluminaba con luz actínica roja (653 nm), se iniciaba el transporte electrónico. Aplicando pulsos de saturación, era posible determinar el rendimiento fotosintético a través de la máxima fluorescencia alcanzada (F_M'). Cada valor de F_M' correspondía a la



fluorescencia debida a la máxima reducción durante el curso de la iluminación con luz actínica. La diferencia entre F_M y F_M' representaba la fracción de Q_A que no se estaba reduciendo y se asociaba con la activación de mecanismos de disipación de energía (*Non-photochemical quenching*, NPQ). Con estos valores se podían evaluar parámetros como el rendimiento cuántico efectivo del PSII (Ecuación 5), la velocidad de transporte electrónico lineal en el PSII (Ecuación 6) y NPQ o “*quenching*” no fotoquímico de la fluorescencia de la clorofila, es un indicador del nivel de disipación de energía (Ecuación 7).

Ecuación 4

$$\frac{F_V}{F_M} = \frac{F_M - F_0}{F_0}$$

(F_V = fluorescencia variable F_M = fluorescencia máxima; F_0 = fluorescencia basal)

Ecuación 5

$$Y(II) = \frac{F_M' - F'}{F_M'}$$

(F_M' = fluorescencia máxima en células adaptadas a la luz; F' = fluorescencia mínima en células adaptadas a la luz).

Ecuación 6

$$ETR(II) = Y(II) \times E_{PAR} \times fAQ_{PSII} \times a$$

($Y(II)$ = rendimiento PSII; E_{PAR} = energía fotosintéticamente activa; fAQ_{PSII} : fracción absorbida por el PSII; a = coeficiente de absorción).

Ecuación 7

$$NPQ = \frac{F_M - F_M'}{F_M'}$$

(F_M = fluorescencia máxima; F_M' = fluorescencia máxima en células adaptadas a la luz).

2.5 CITOMETRÍA DE FLUJO

Para analizar las características de los tipos celulares presentes en los cultivos se empleó un citómetro Influx™ (Becton & Dickinson) equipado con un láser sólido no gaseoso de 488 nm (Coherent Sapphire 488-200 CDRH OPSL Blue Laser 200 mW). Los parámetros evaluados fueron tamaño y complejidad celular y fluorescencia en el rango de 580/40 nm (indicativa del contenido en astaxantina).

Las muestras recogidas (1 ml) recogidas cada 2 horas de cada cultivo se fijaron con paraformaldehído 3,5% en tampón fosfato salino (PBS 10x), incubando a 4°C en agitación durante 30 minutos. Las células se lavaron 3 veces consecutivas con PBS (1x) para retirar el exceso de fijador y se resuspenden en 1 ml de PBS. El citómetro tomaba un volumen determinado de muestra que contuviera 10.000 células para su análisis a través de un *Nozzle* con un diámetro de 100 µm.

2.6 MICROSCOPIA ÓPTICA

Las muestras se visualizaron en portaobjetos excavado, utilizando un microscopio óptico (Zeiss West Germany) equipado con una cámara digital (AxioCam ICc1). El tratamiento digital de las imágenes con el software ZEN 2012 (blue edition) permitió determinar el diámetro celular.

2.7 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Para la fijación de células, se centrifugó 1 ml de cultivo (1 minuto, 12100 x g). El sedimento, lavado con formiato amónico (1 %) se trató con 1 ml de glutaraldehído 2,5 % en tampón cacodilato (0,1 M, pH 7,38) incubándose a 4°C en agitación durante 2 horas, realizando 5 lavados con el mismo tampón.

Para la inclusión en la resina, las células fijadas se lavaron de nuevo con tampón cacodilato 15 minutos a 4 °C (3 veces). Se incubaron con tetraóxido de osmio 1 % durante 1 h a 4 °C seguido de 3 lavados con agua destilada. Seguidamente, se



incubaron con uranilo 2 %, 2 horas a 25 °C. Las muestras se deshidrataron con disoluciones de acetona en un gradiente de 50 %, 70 %, 90 % (cada incubación de 30 minutos a 25 °C) y 100 % (2 incubaciones secuenciales de 20 minutos a 25 °C). Posteriormente, se realizaron tres incubaciones consecutivas de 2 minutos a 25°C utilizando acetona:resina en proporciones 3:1, 1:1 y 1:3 respectivamente. Finalmente, las células se incluyeron en resina 100 % e incubaron a 25 °C 15 minutos.

Para la obtención de cortes ultrafinos (50-70 nm) se utilizó un ultramicrotomo Leica UC7 (Leica Microsystems) que se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) (Libra 120 Plus; Zeiss Iberia).

2.8 MEDIDA DE IRRADIANCIA

Para la medida de la irradiancia fotosintéticamente activa (PAR) que incidía sobre el cultivo se utilizó un sensor de irradiancia de escala cuántica QSL-100 (BIOSPHERICAL INSTRUMENTS INC., San Diego, CA) tipo 4π colocado en el interior del quimioestado en agua. El ciclo solar simulado al que se sometía a los cultivos se representa en la Figura 15.

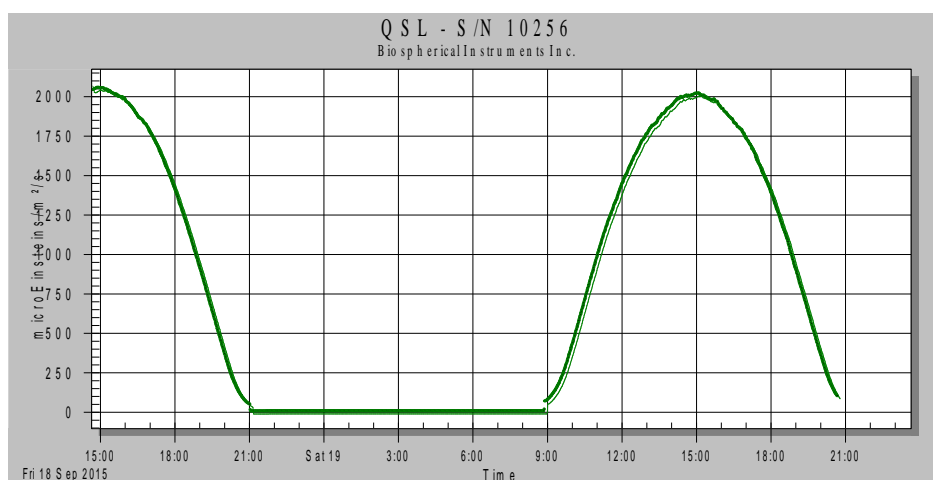


Figura 15. Medidas de irradiancia en el transcurso del ciclo solar simulado. Irradiancia máxima $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Comienzo del periodo de iluminación: 9.00 a.m. Fin del periodo de iluminación: 21.00 p.m.

2.9 CÁLCULO DEL SUMINISTRO ESPECÍFICO DE NITRATO (SEN)

El parámetro SEN, o “suministro específico de nitrato” indicaba el aporte de nitrato a la célula expresado como $\text{mmol NO}_3^- \text{ g}^{-1}$ de biomasa d^{-1} . Se calculó según la Ecuación 8 (Del Río et al. 2005).

Ecuación 8

$$\text{SEN} = \frac{\text{NO}_3^- \cdot D}{\text{Cb}}$$

(NO_3^- =nitrato en medio de aporte (mM); D=velocidad de dilución (d^{-1}); Cb=concentración de biomasa (g l^{-1})).

2.10 TRATAMIENTO DE DATOS

Los datos presentados correspondían a muestras tomadas en situaciones estabilizadas, siendo valores medios de 4 (cultivos control) o 16 determinaciones (cultivos en limitación) de cada estado estacionario. La estimación de la desviación se realizó mediante el error estándar. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante la prueba “*t de Student*” con un nivel de confianza del 95 % ($p < 0,05$) utilizando Microsoft Excel 2010.

3.1 GENERACIÓN DE CULTIVOS CON DISTINTO NIVEL DE ACUMULACIÓN DE ASTAXANTINA

Para estudiar los cambios metabólicos que acontecen en la etapa inicial de acumulación de astaxantina, se compararon células en los primeros estadios de acumulación de astaxantina (flageladas o palmeloides “rojizas”) con células que no acumularan el pigmento (flageladas o palmeloides verdes), descartando cultivos con quistes donde multitud de procesos estarían alterados, utilizando la limitación nitrogenada como herramienta para inducir la biosíntesis de astaxantina. Los cultivos se operaron en régimen continuo para mantener poblaciones estables asegurando la reproducibilidad de los datos.

Las experiencias se desarrollaron bajo la influencia de un ciclo solar simulado, de manera que se trabajaba con estados estacionarios dinámicos, donde cada 24 horas se mantenían constantes las condiciones de disponibilidad de luz y nutrientes. Una vez alcanzado el estado estacionario, se tomaron muestras (al menos cuatro) durante una semana.

En estudios anteriores con *Haematococcus pluvialis* operados en modo estanco (Del Río et al. 2005) se estableció el Medio Inorgánico como idóneo para el cultivo de esta microalga. Sin embargo, debido a su facilidad de preparación, se consideró interesante evaluar el medio Arnon (Arnon et al. 1974) en condiciones de cultivo continuo. Los resultados obtenidos (Figura 16) permitieron descartar el medio Arnon para la operación en continuo, debido a la formación de precipitados y al amarilleamiento del cultivo.



Figura 16. Cultivos de *Haematococcus pluvialis* crecidos en medio Arnon (izquierda) y Medio Inorgánico (derecha). Condiciones experimentales: velocidad de dilución $0,3 \text{ d}^{-1}$, ciclo solar simulado $I_{0 \text{ MAX}} 2500 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, nitrato en el medio de aporte 15 mM .

Se seleccionó el Medio Inorgánico, pero al doble de concentración (x2) para que ningún nutriente resultase limitante cuando se utilizasen a velocidades de dilución bajas.

3.1.1 EFECTO DE LA VELOCIDAD DE DILUCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE NITRATO EN EL MEDIO DE APORTE

La acumulación de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* está fuertemente influenciada por la disponibilidad de nitrato (Del Río et al. 2005). En un cultivo continuo, dicha disponibilidad depende del nitrato presente en el medio de aporte, de la velocidad a la que se suministra (velocidad de dilución) y de la biomasa del cultivo. Para establecer la combinación de velocidad de dilución y nitrato en el medio de aporte que permitiera disponer de dos cultivos morfológicamente homogéneos, uno de células verdes que no acumulasen astaxantina y otro de células rojizas que sí acumulasen el pigmento, se ensayaron velocidades de dilución de $0,3$, $0,5$, $0,7$, $0,8$ y $0,9 \text{ d}^{-1}$ para concentraciones de nitrato en el medio de aporte de 1 , 2 , 3 , 5 y 15 mM , analizando acumulación de astaxantina y morfología en cada estado estacionario,

completando su caracterización con crecimiento y composición elemental de la biomasa. Se establecieron como condiciones de cultivo: temperatura 25 °C, pH 7, irradiancia máxima durante el ciclo solar simulado de $2500 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y caudal de aire $16,7 \text{ l aire (l cultivo)}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Las muestras se tomaron a las 6 horas desde el inicio del periodo de iluminación, cuando se alcanzaba la máxima irradiancia incidente. En general, el aumento en concentración de nitrato en el medio de aporte hasta 5 mM, suponía un incremento de la biomasa para todas las velocidades de dilución ensayadas. Para una concentración de nitrato determinada, la biomasa era mayor cuanto menor fuera la velocidad de dilución (Figura 17).

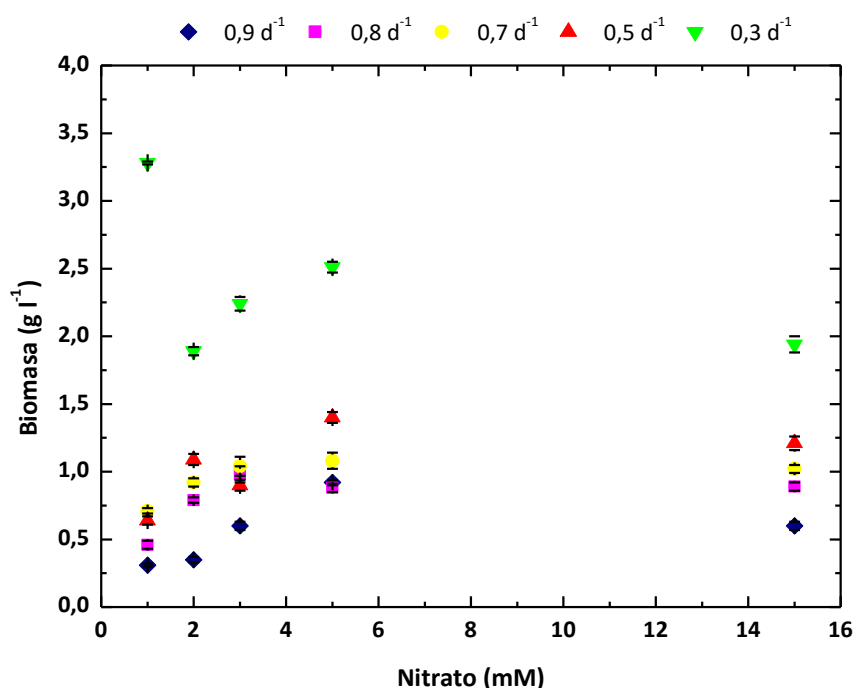


Figura 17. Influencia de la concentración de nitrato en el medio de aporte y velocidad de dilución sobre la biomasa de *Haematococcus pluvialis* en cultivo continuo. Condiciones experimentales: temperatura 25 °C, pH 7, ciclo solar simulado $I_{0 \text{ MAX}} 2500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y caudal de aire $16,7 \text{ l aire (l cultivo)}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de iluminación. Se muestra el error estándar para $n=4$.

Respecto a la acumulación de astaxantina, para todas las velocidades de dilución ensayadas, las concentraciones de nitrato de 15 y 5 mM se podían considerar

condiciones de suficiencia, ya que apenas se registraba acumulación (aproximadamente 0,016 % para todas las velocidades de dilución a 15 mM y 0,050 – 0,060 % para 5 mM). A partir de 3 mM se producía un notable incremento en la acumulación de astaxantina, salvo para la velocidad de dilución de $0,9 \text{ d}^{-1}$. A concentraciones de nitrato inferiores a 3 mM, se registró acumulación para todas las velocidades de dilución ensayadas, aumentando el contenido en astaxantina a medida que disminuía la velocidad de dilución. La máxima acumulación del pigmento (0,734 % y 0,711 %) se obtuvo en cultivos a velocidad de dilución de 0,3 y $0,5 \text{ d}^{-1}$ suplementados con nitrato 1 mM (Figura 18).

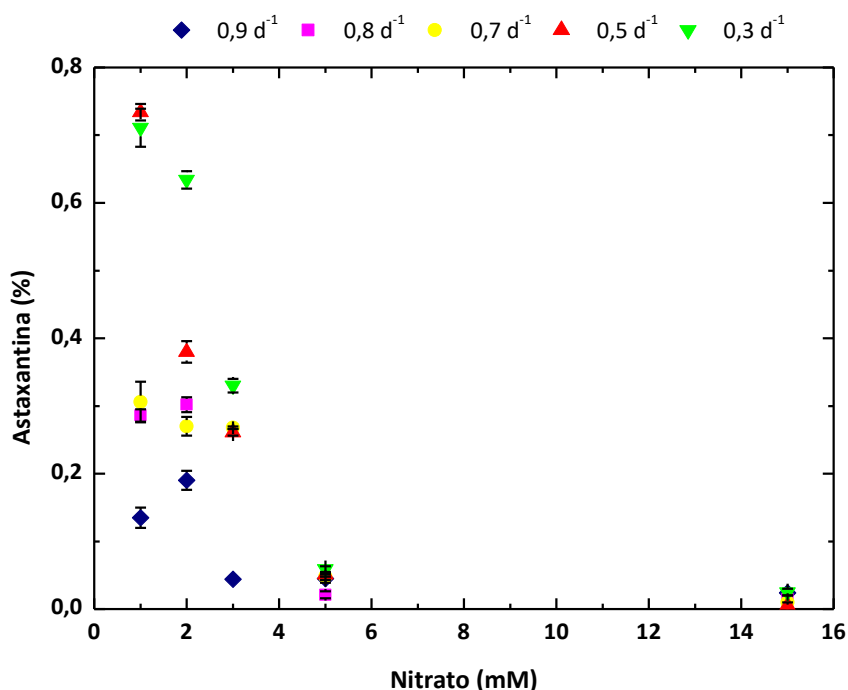


Figura 18. Influencia de la concentración de nitrato en el medio de aporte y velocidad de dilución sobre el contenido de astaxantina de la biomasa de *Haematococcus pluvialis* en cultivo continuo. Condiciones experimentales descritas en la Figura 17. Se muestra el error estándar para $n=4$.

Teniendo en consideración estos resultados, se podría establecer la condición de 3 mM de nitrato como valor a partir del cual se desencadenaría situaciones de limitación de nitrógeno (manifestadas por la reducción de biomasa y aumento del contenido en astaxantina) para todas las velocidades de dilución ensayadas y a la

irradiancia establecida, excepto para el caso de la velocidad de $0,9 \text{ d}^{-1}$ que ocurriría en la condición de nitrato de 2 mM.

Las distintas combinaciones de velocidad de dilución, nitrato en el medio de aporte y concentración de biomasa en el cultivo, permiten definir la disponibilidad de nitrato para cada célula. Es lo que se denomina *suministro específico de nitrato* (SEN), que unifica en un solo valor las tres variables expresado en $\text{mmol NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Del Río et al. 2005). La Figura 19 muestra la influencia del suministro específico de nitrato sobre la acumulación de astaxantina. Ésta se incrementaba a medida que el valor de SEN era menor, de manera que analizando el comportamiento global, se observaba acumulación para valores inferiores a $2 \text{ mmol g}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

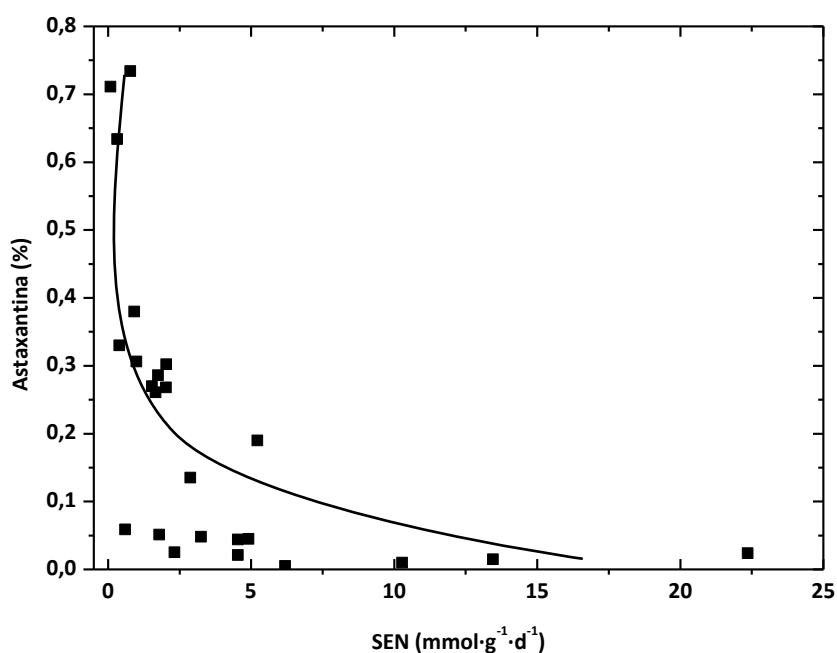


Figura 19. Influencia del suministro específico de nitrato (SEN) sobre el contenido de astaxantina de *Haematococcus pluvialis* en cultivo continuo.

En la Tabla 6 se muestra el contenido en nitrógeno de la biomasa.

Tabla 6. Contenido en nitrógeno de la biomasa (%) en función de la concentración de nitrato (mM) en el medio de aporte y velocidad de dilución impuesta (d^{-1}) en cultivo continuo. Condiciones experimentales descritas en la Figura 17.

D [NO₃⁻]	0,9	0,8	0,7	0,5	0,3
15 mM	6,9 ± 0,2	8,0 ± 0,5	7,9 ± 0,1	7,7 ± 0,3	7,0 ± 0,2
5 mM	6,2 ± 0,4	6,7 ± 0,2	6,3 ± 0,8	6,1 ± 0,4	6,2 ± 0,6
3 mM	6,6 ± 0,0	N.D	4,8 ± 0,6	3,7 ± 0,1	3,4 ± 0,1
2 mM	6,1 ± 0,2	4,7 ± 0,2	4,6 ± 0,3	3,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1
1 mM	4,2 ± 0,1	3,0 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,8 ± 0,6	1,7 ± 0,1

*N.D: no determinado; En **rojo** se muestran las condiciones donde se observó acumulación de astaxantina según datos de la Figura 18.

La acumulación de astaxantina se produjo, de manera general, para nivel celular de nitrógeno inferior a 5 % a excepción de la condición de $0.9 d^{-1}$ 2 mM, que registró acumulación de astaxantina (0,2 %) con un contenido de nitrógeno en torno al 6 %. En la Figura 20 se relaciona el contenido intracelular de nitrógeno y la acumulación de astaxantina, observando que la acumulación de astaxantina incrementaba drásticamente cuando el contenido en nitrógeno de la biomasa era inferior al 5 %. Los valores máximos de astaxantina (0,6 – 0,7 %) se correspondían con contenido en nitrógeno del 2,8 %, velocidad de dilución de $0,5 d^{-1}$, 1 mM de nitrato en el medio y un SEN de $0,78 \text{ mmol NO}_3^- \text{ g}^{-1} d^{-1}$ y con la condición de velocidad de dilución de $0,3 d^{-1}$, contenido en nitrógeno en torno al 2 %, nitrato en el medio 2 y 1 mM y un SEN de 0,32 y $0,09 \text{ mmol NO}_3^- \text{ g}^{-1} d^{-1}$ respectivamente.

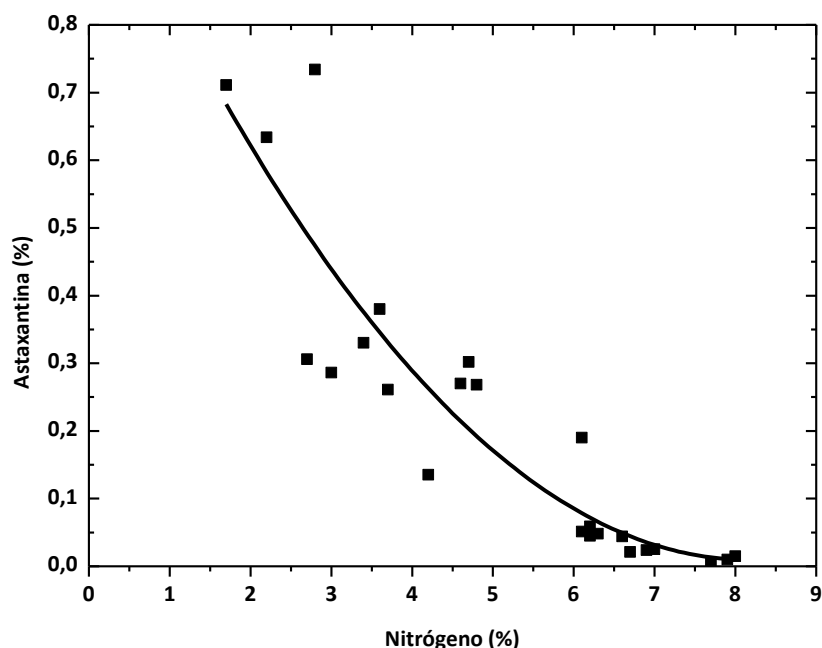


Figura 20. Correlación entre los contenidos en nitrógeno y astaxantina de la biomasa de *Haematococcus pluvialis* en cultivo continuo.

El estudio se completó con la observación, mediante microscopía óptica, de los cultivos obtenidos en los experimentos anteriores para conocer la morfología que predominaba en cada una de las condiciones experimentales, y así definir la combinación de concentración de nitrato en el medio de aporte y velocidad de dilución que permitían obtener cultivos homogéneos de los dos tipos celulares (Figura 21).

A concentraciones de 15 y 5 mM, los cultivos estaban formados por células verdes, flageladas o palmeloides, independientemente de la velocidad de dilución utilizada. A concentraciones de nitrato de 3 y 2 mM, se observaban células rojizas de todos los morfotipos, flageladas, palmeloides y quistes, compatible con la acumulación de astaxantina, siendo mayor la proporción de quistes al disminuir la velocidad de dilución. A 1 mM predominaban los quistes a todas las velocidades de dilución ensayadas. La acumulación de astaxantina se observaba cuando el nitrato en el medio de aporte era igual o inferior a 3 mM.

Para velocidades de dilución iguales o inferiores a $0,7 \text{ d}^{-1}$ y nitrato igual o inferior a 3 mM, la población celular estaba compuesta por mezcla de morfotipos con predominio de palmeloides rojizas de distintos tamaños derivando a quistes a medida que disminuía la velocidad de dilución y la concentración de nitrato. Para velocidades de dilución altas ($0,9$ y $0,8 \text{ d}^{-1}$) se observaba la aparición de células rojizas cuando la concentración de nitrato era 3 mM, siendo más evidente a 2 y 1 mM.

Atendiendo al criterio de homogeneidad de morfotipos en el cultivo, se seleccionó la condición de 2 mM de nitrato y $0,7$ y $0,8 \text{ d}^{-1}$ de velocidad de dilución para generar cultivos que empezaban a acumular astaxantina. Para obtener cultivos verdes se establecieron las mismas condiciones de velocidad de dilución y 15 mM de nitrato en el medio de aporte.

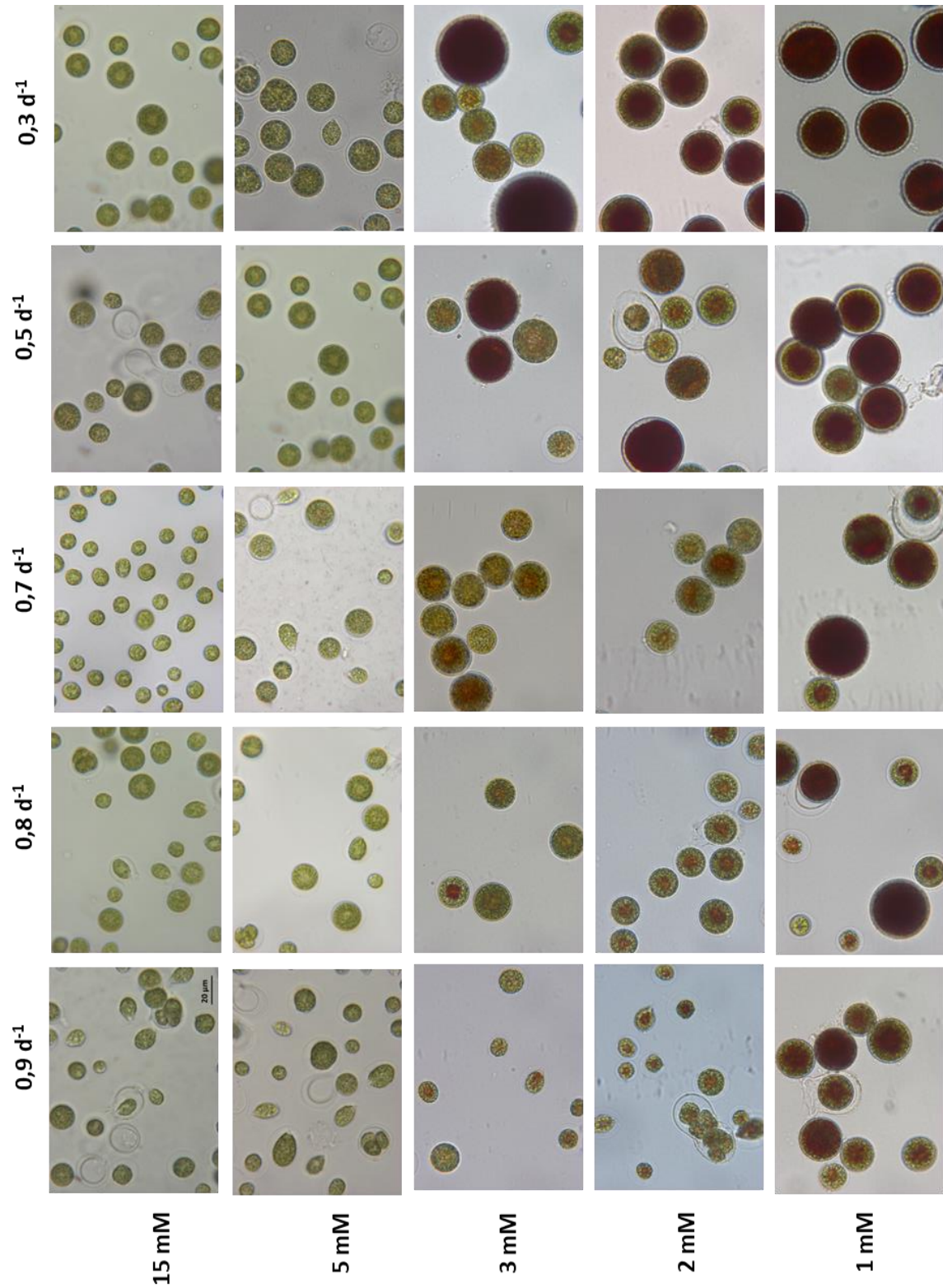


Figura 21. Morfología de cultivos *Haematococcus pluvialis* a distintas velocidades de dilución y concentraciones de nitrato. Condiciones experimentales descritas en la Figura 17. Barra de tamaño 20 µm igual para todas las imágenes.

3.1.2 EFECTO DE LA IRRADIANCIA INCIDENTE

Los cultivos con 2 mM de nitrato en el medio de aporte y velocidad de dilución de 0,7 y 0,8 d⁻¹, que se encontraban en estado estacionario, determinado por la concentración constante de biomasa, cambiaban de coloración (de verdoso a marrón) en días consecutivos de cultivo, lo que podría implicar cambios en el contenido de astaxantina. Considerando el papel regulador de la luz en la carotenogénesis, se ensayaron regímenes de iluminación alternativos, en concreto, ciclos de luz:oscuridad (12:12) y ciclos solares simulados de menor irradiancia máxima, para determinar su efecto sobre homogeneidad de los cultivos.

3.1.2.1 Ciclos luz - oscuridad (12:12)

Dado el papel sincronizador que se atribuye a los ciclos de luz – oscuridad (Mocquet et al. 2010), se analizó la morfología y coloración de cultivos sometidos a ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con 1300 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, de irradiancia en el periodo de iluminación. De esta forma, se mantenía la radiación total que recibía el cultivo a lo largo del día utilizada en los experimentos anteriores, y sólo se modificaba su distribución a lo largo de las 24 horas. Datos complementarios de crecimiento y contenido de nitrógeno en la biomasa se presentan en el anexo (Tabla A.2).

Durante el estado estacionario, los cultivos eran más verdosos y menos homogéneos que los que se operaban con las mismas condiciones de velocidad de dilución y concentración de nitrato bajo la influencia del ciclo solar simulado, especialmente a velocidad de dilución de 0,7 d⁻¹ (Figura 22).

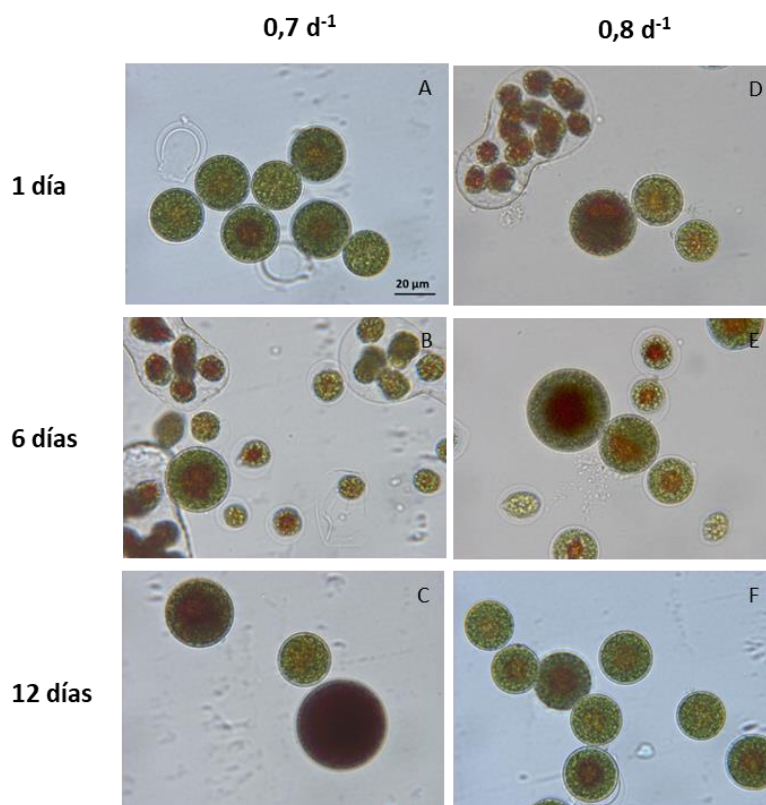


Figura 22. Evolución de la morfología celular de cultivos en limitación (2 mM nitrato) de *Haematococcus pluvialis* sometidos a ciclos de luz-oscuridad (12:12, 1300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en estado estacionario. **A y D:** 1º día estado estacionario; **B y E:** 6º día; **C y F:** 12º día. Condiciones experimentales: velocidad de dilución 0,7 d^{-1} (columna izquierda) y 0,8 d^{-1} (columna derecha). Resto de condiciones descritas en la Figura 17. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de iluminación. Barra de tamaño 20 μm igual para todas las imágenes.

Por tanto, este régimen de iluminación no mejoraba la homogeneidad de los cultivos de células rojizas.

3.1.2.2 Ciclo solar simulado con irradiancia máxima de 2000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

En este caso se mantenía el ciclo solar simulado pero reduciendo la irradiancia máxima (2000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y en consecuencia la cantidad de luz que incidía en el cultivo durante 24 horas.

Para velocidad de dilución de $0,8 \text{ d}^{-1}$ (Figura 23) se observó homogeneidad en las células palmeloides rojizas durante el estado estacionario. Sin embargo, a $0,7 \text{ d}^{-1}$, la población no era homogénea en cuanto a tamaño y se observaban algunos quistes.

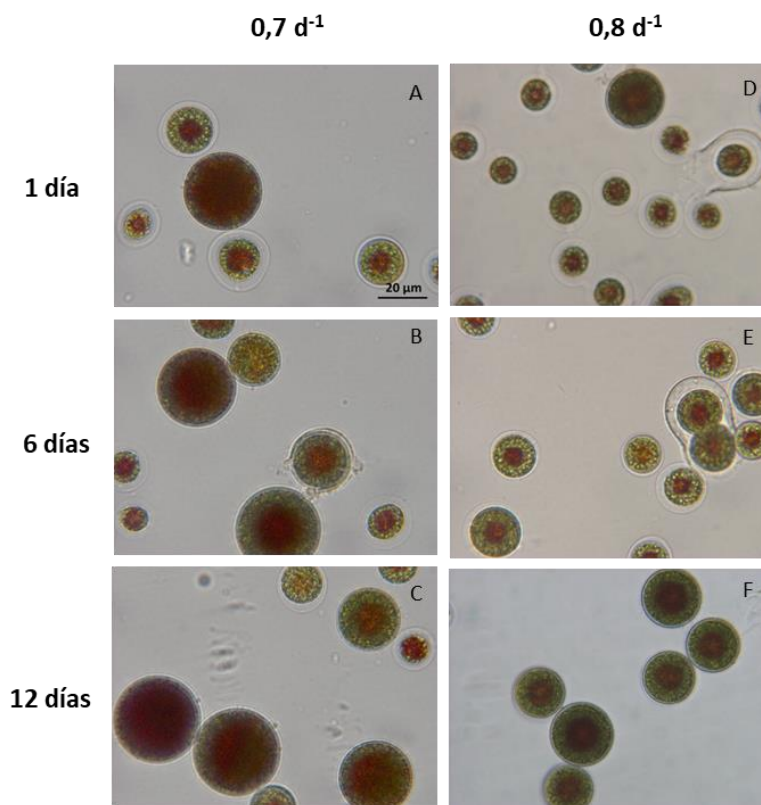


Figura 23. Evolución de la morfología celular de cultivos con acumulación de astaxantina (2 mM nitrato) de *Haematococcus pluvialis* sometidos a ciclo solar simulado ($I_{0 \text{ MAX}} 2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) durante el estado estacionario. **A y D:** 1º día estado estacionario; **B y E:** 6º día; **C y F:** 12º día. Condiciones experimentales: velocidad de dilución $0,7 \text{ d}^{-1}$ (columna izquierda) y $0,8 \text{ d}^{-1}$ (columna derecha) Resto de condiciones descritas en la Figura 17. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de iluminación. Barra de tamaño $20 \mu\text{m}$ igual para todas las imágenes.

Por tanto, la condición de $0,8 \text{ d}^{-1}$ y 2 mM de nitrato en el medio de aporte, con ciclo solar simulado a una irradiancia máxima de $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ resultó la condición más idónea para generar de cultivos de *Haematococcus pluvialis* homogéneos de células palmeloides que estaban iniciando la acumulación de astaxantina.

3.2 OPTIMIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA MEDIR ÁCIDOS ORGÁNICOS Y AZÚCARES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES-MASAS

La metodología generalmente empleada para la determinación de ácidos orgánicos en muestras biológicas es la cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas (Kombu et al. 2011). Aunque esta técnica se ha aplicado a *Haematococcus pluvialis* (Recht et al. 2014), algunos ácidos orgánicos no podían cuantificarse. Dado el interés de disponer de una información amplia y fiable de la mayor cantidad posible de metabolitos que podrían relacionarse con la acumulación de astaxantina, se procedió a la optimización de los protocolos de detección de los intermediarios del *Ciclo del Ácido Cítrico* (TCA) y de azúcares.

El método de detección de un espectrómetro de masas depende del tipo de analizador de iones empleado. De manera general, se analiza la variación de uno o varios parámetros que controlan la trayectoria de los iones de forma que, sucesivamente, el detector se va enfocando en aquellos iones que presentan una determinada relación masa/carga, obteniendo así una señal variable frente al tiempo. Existen dos modos de detección de iones: barrido completo (*full scan*), el más común, cuando el intervalo de masas cubre todos o la mayor parte de los iones producidos, y el modo selectivo (*selected ion monitoring*, SIM) cuando en lugar de realizar un barrido completo, se reduce el intervalo, limitándolo a la zona del espectro de masas de interés, pudiendo en un caso extremo eliminar el barrido completo y fijar la detección de un solo ión.

Para establecer la concentración mínima de intermediarios del ciclo de TCA cuantificable mediante cromatografía de gases, se prepararon once patrones comerciales conteniendo una mezcla de los ácidos oxalacético, pirúvico, succínico, fumárico, málico, α -cetoglutárico y cítrico a concentraciones de 2, 8, 15, 25, 30, 40, 100, 200, 400, 600, 800 μ M y se analizaron mediante CG-MS (ver condiciones de la cromatografía en Materiales y Métodos).

En la Figura 24 se muestra, como ejemplo, el cromatograma correspondiente a la mezcla de ácidos orgánicos a concentración de 200 μM operando en el modo de detección *full scan*.

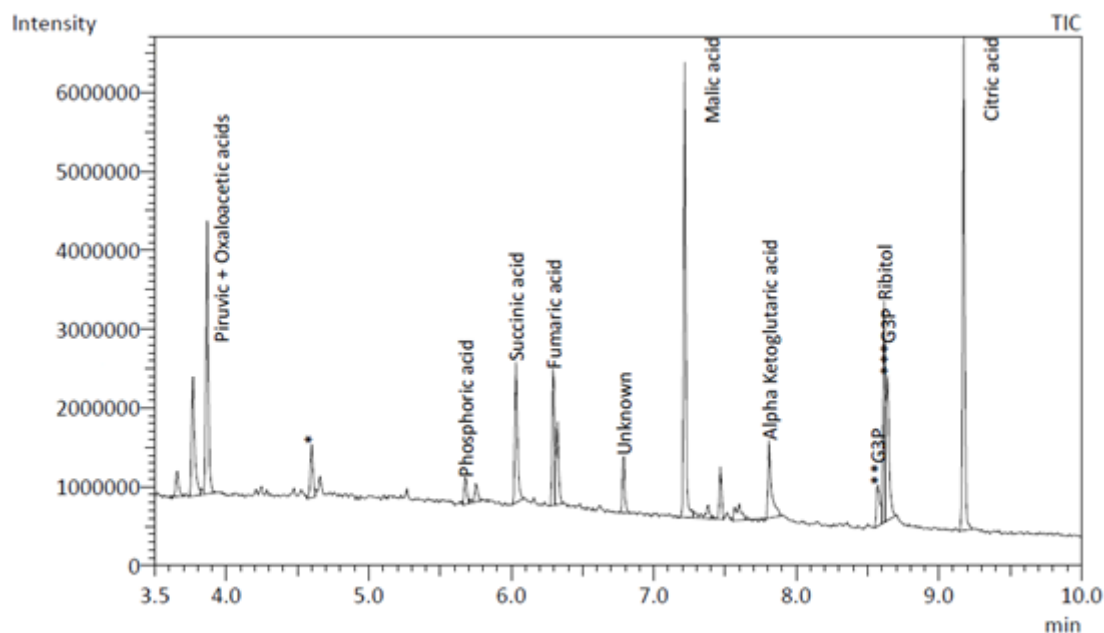


Figura 24. Perfil de la mezcla de estándares de ácidos orgánicos (200 μM). Patrón interno: ribitol (40 μM) *Oxima del ácido pirúvico. ** Oxima del G3P. ***Metil-oxima del G3P. Resto de picos no identificados correspondientes a residuos de la derivatización.

La señal del detector (*Intensity*) dependía del grado de ionización de cada ácido de manera que, a igualdad de concentración, algunos ácidos podían no ser detectados si su ionización era baja. En el ejemplo presentado en la Figura 24, al ácido α -cetoglutarico 200 μM , le correspondía un pico pequeño, próximo al límite de detección. En los patrones de concentraciones inferiores a 200 μM , el α -cetoglutarico no se detectaba (Figura 25 A).

El modo de detección *full scan*, por tanto, no permitía detectar compuestos presentes a una baja concentración en la muestra y/o que tuvieran un alto límite de detección (LOD). Como alternativa se utilizó el modo de detección SIM. Los criterios para elegir los iones que se monitorizaron en modo SIM fueron: los iones debían tener

la máxima abundancia relativa en cada compuesto, ser los más representativos en el patrón de ionización de ese compuesto y estar presentes a una abundancia relativa que no saturase. En caso de saturación, se elegiría el siguiente ión más representativo del compuesto y así sucesivamente.

Siguiendo los criterios mencionados, para el caso del ácido α -cetoglutarico, se seleccionó el ión 73 (m/z) y se registró sólo en su intervalo de tiempo de retención correspondiente (RT, 7,70 - 7,90 min). Esto permitió aumentar hasta 50 veces la sensibilidad, detectando el ácido α -cetoglutarico a concentraciones tan bajas como 2 μM (Figura 25 B).

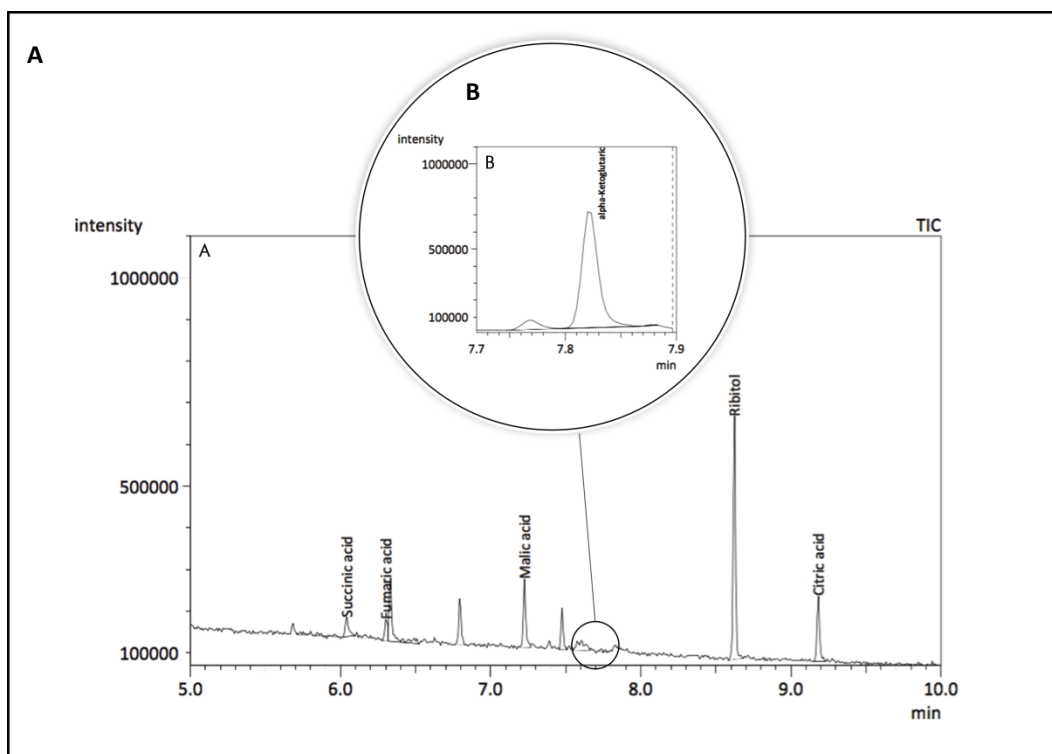


Figura 25. A: GC-MS (*full scan*). Perfil de una mezcla de estándares de ácidos orgánicos (100 μM). B: GC-MS (SIM) cromatograma del ión 73 (m/z) monitorizado en el intervalo 7,70-7,90 min correspondiente al ácido α -cetoglutarico.

Al aplicar la metodología habitual (Kombu et al. 2011), no se pudo diferenciar entre pirúvico y oxalacético. Cuando se sometieron a CG-MS, mezclas de oxalacético y pirúvico, a 200 y 400 μM , ambos ácidos aparecieron con el mismo tiempo de retención, aunque la señal del oxalacético era el doble que la del pirúvico (Figura 26).

Es posible que la sililación, que tiene lugar durante el proceso de derivatización, se estuviera produciendo en los hidrógenos activos de los grupos carboxilos (dos en el caso del oxaloacético frente a uno en el caso del pirúvico) y que al romperse la molécula de oxaloacético se comportase como dos moléculas de pirúvico.

A pesar de que se realizaron modificaciones en la temperatura del inyector y de la columna, no mejoró la separación de los picos.

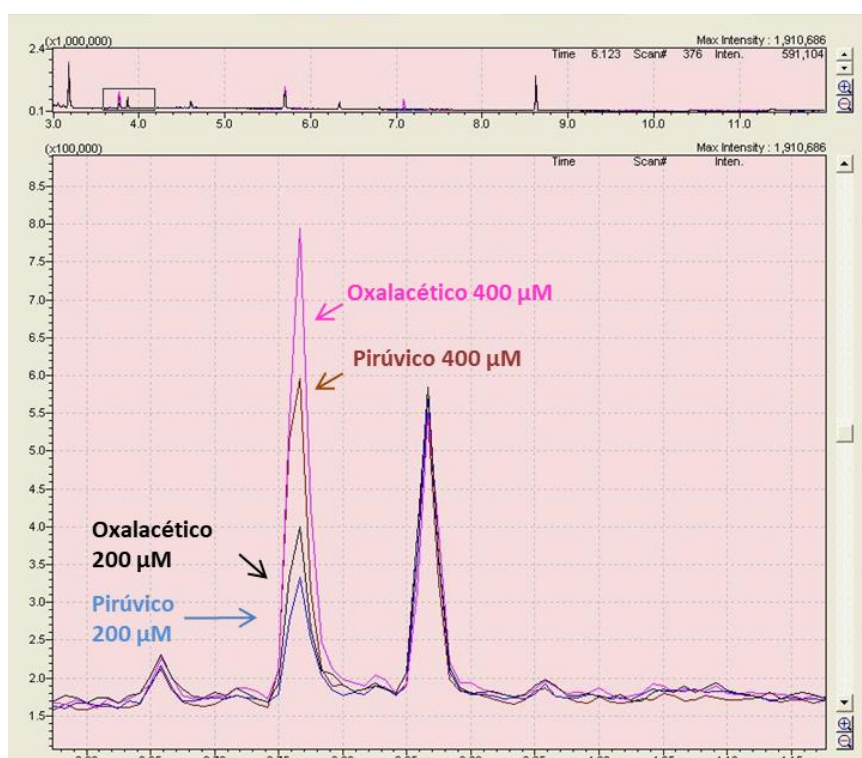


Figura 26. Captura de pantalla realizada en el CG-MS donde se muestra la superposición de los cuatro picos resultantes del análisis de ácido oxalacético/ácido pirúvico 200 - 400 μM . (Rosa: ácido oxalacético 400 μM ; Marrón: ácido pirúvico 400 μM ; Negro: ácido oxalacético 200 μM ; Azul: ácido pirúvico 200 μM). El segundo pico mostrado a RT 3,87 minutos corresponde a un residuo de la derivatización. Eje de ordenadas, intensidad; Eje de abscisas, tiempo de retención.

La imposibilidad de separar ambos picos podría deberse a la descarboxilación en solución acuosa de oxaloacético en pirúvico y CO₂, mediante una descomposición cetónica (Pedersen 1952) (Figura 27).

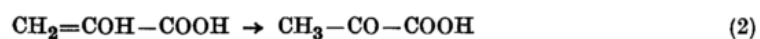
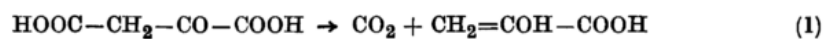


Figura 27. Descomposición del OAA en ácido pirúvico. **(1)** Descarboxilación del OAA en CO₂ y forma “enol” del ácido pirúvico. **(2)** Transformación de la forma enólica del ácido pirúvico en ácido pirúvico. Fuente: Pedersen 1952.

La aplicación de otra técnica analítica, HPLC, tampoco permitió la separación de ambos ácidos. Cuando se analizaba un patrón de ácido oxalacético se observaban dos picos, uno coincidente con el tiempo de retención del pirúvico (RT 9,8 min) y otro anterior (RT 8,3 min) correspondiente al oxalacético (Figura 28 A). Sin embargo, el patrón de ácido pirúvico se detectaba como un único pico al tiempo de retención de 9,8 minutos (Figura 28 B), justificable por la descarboxilación espontánea del oxalacético en medio acuoso ya referida.

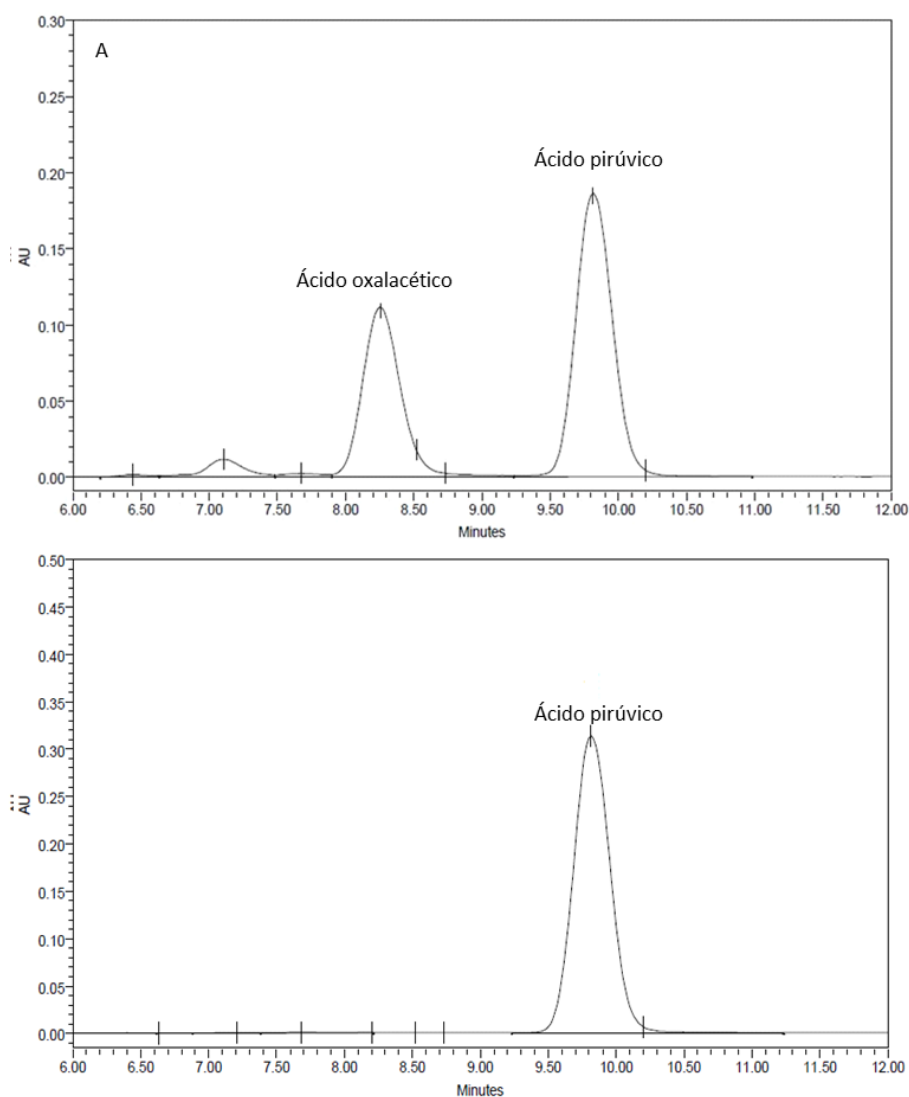


Figura 28. Perfiles de estándares de ácidos oxalacético (A) y pirúvico (B) (5 mM) monitorizada mediante HPLC.

Por lo tanto, no fue posible separar y cuantificar ácido pirúvico de ácido oxalacético tratándolos en adelante de forma conjunta.

Al aplicar la metodología optimizada de CG-MS a partir de los patrones a las muestras recogidas de cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*, se observaron problemas en la detección de algunos ácidos (fumarato y α -cetoglutarato) (Figura 29. A), bien por su límite de detección o bien porque estuvieran a baja concentración en la muestra, por lo que se analizaron en modo SIM (Figura 29. B y C) monitorizando sólo



los iones de interés y en los intervalos de tiempo de retención correspondiente a cada pico (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones de detección en modo SIM para ácidos fumárico y α -cetoglutarico en muestras de *Haematococcus pluvialis*.

Ácido orgánico	Ión seleccionado	Intervalo de RT (min)
Fumárico	73	6,30 – 6,50
α -cetoglutarico	73	7,70 – 7,90

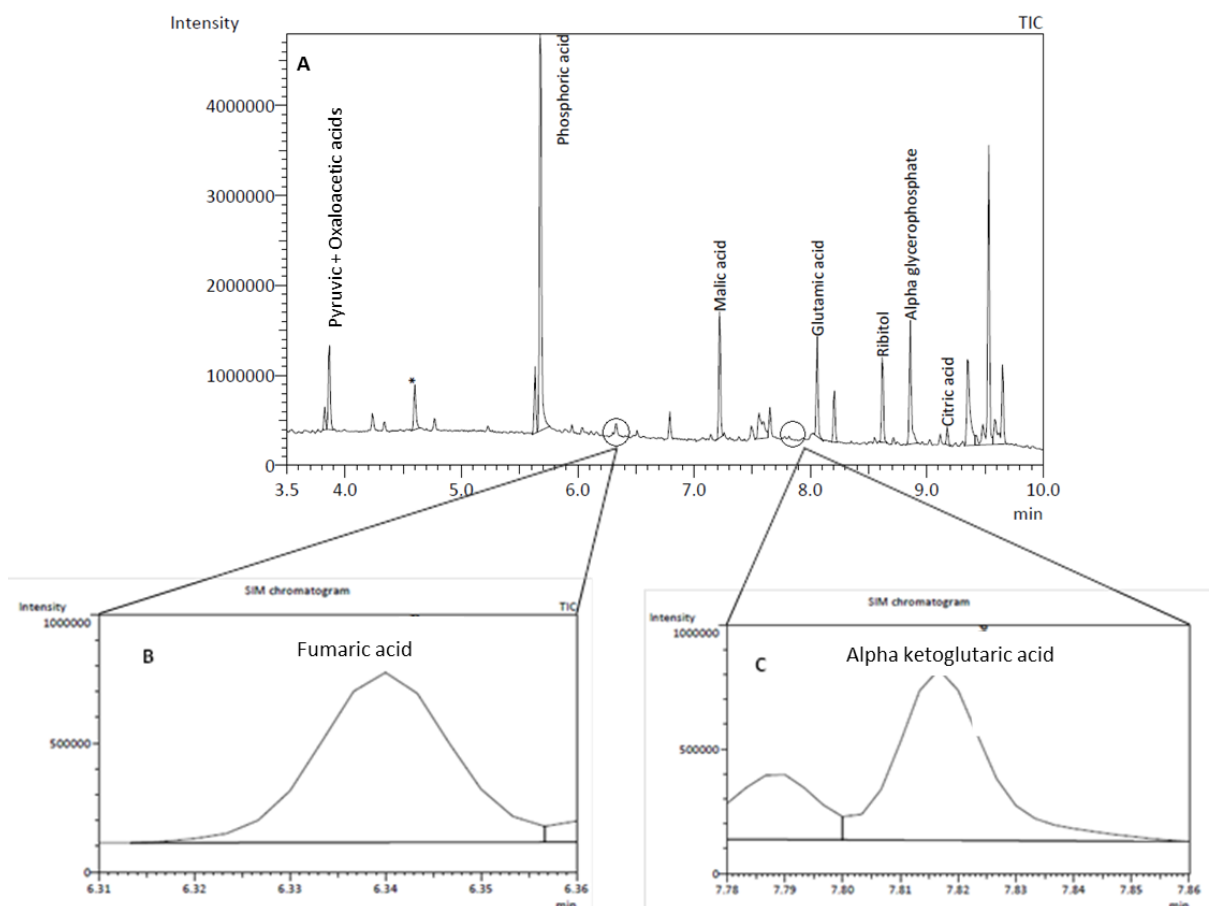


Figura 29. Perfiles de ácidos orgánicos de cultivos de *Haematococcus pluvialis* crecido a una velocidad de dilución de $0,8 \text{ d}^{-1}$ en condiciones de suficiencia de nitrato (15 mM). **A:** GC–MS (*full scan*). **B:** GC–MS (SIM) cromatograma del ión 73 (m/z) del ácido fumárico. **C:** GC–MS (SIM) cromatograma del ión 73 (m/z) del ácido α -cetoglutarico. *Oxima del ácido pirúvico. Resto de picos no identificados corresponden a residuos de la derivatización.

Por tanto, la combinación de los dos métodos de detección permitió identificar los ácidos orgánicos del TCA aunque se encontrasen a baja concentración en la muestra, excepto la limitación comentada de separar los ácidos pirúvico y oxalacético.

La cuantificación se realizó mediante comparación con rectas de calibrado para cada compuesto, tratadas de la misma forma que la muestra problema y con el método de detección adecuado (*full scan* o SIM), verificando previamente la existencia o no de interferencias con componentes celulares de los extractos de microalgas así como la eficiencia de la derivatización, mediante la adición de un patrón interno.

3.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y METABOLÓMICA DE CULTIVOS CON DISTINTO NIVEL DE ACUMULACIÓN DE ASTAXANTINA DURANTE EL CICLO SOLAR SIMULADO

Se generaron cultivos verdes, en suficiencia de nitrato (15 mM NO_3^- y $0,8 \text{ d}^{-1}$) sin astaxantina y cultivos rojizos, en limitación moderada (2 mM NO_3^- y $0,8 \text{ d}^{-1}$) con acumulación del pigmento ($0,23 \%$ de la biomasa), analizándose el perfil y contenido de diversos metabolitos así como su morfología (Figura 30).



Figura 30. Cultivo continuo de *Haematococcus pluvialis* sin acumulación de astaxantina (15 mM de nitrato) (A) y con acumulación de astaxantina (2 mM de nitrato) (B). Condiciones experimentales: velocidad de dilución $0,8 \text{ d}^{-1}$, temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 7, ciclo solar simulado $I_{0 \text{ MAX}} 2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y caudal de aire $16,7 \text{ l aire (l cultivo)}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de iluminación.

3.3.1 MORFOLOGÍA

Para analizar las diferencias morfológicas entre cultivos de *Haematococcus pluvialis* con y sin acumulación de astaxantina, se realizaron observaciones mediante microscopía óptica y electrónica.

Los cultivos crecidos en suficiencia de nitrato estaban formados por células verdes, mayoritariamente palmeloides. Su tamaño oscilaba entre 10 y $15 \mu\text{m}$ en el caso de las flageladas y de $20 \mu\text{m}$ para las palmeloides (Figura 31. A). Los cultivos

crecidos en limitación de nitrato contenían células palmeloides que en el centro acumulaban astaxantina. Su tamaño medio era de 20 - 25 μm (Figura 31. B).

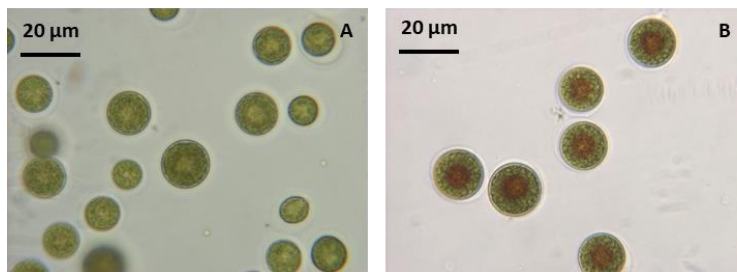


Figura 31. Cultivos de *Haematococcus pluvialis* sin acumulación de astaxantina (15 mM de nitrato) (A) y con acumulación de astaxantina (2 mM de nitrato) (B). Condiciones experimentales descritas en la Figura 30.

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 32) reflejaba cambios en la ultraestructura. En cultivos en suficiencia de nitrato (Figura 32 A), aparecían gotas redondeadas, electrodensas, de varios tamaños, correspondientes a vesículas lipídicas que aumentaban de tamaño al pasar a una situación de limitación nitrogenada (Figura 32 B). En esta situación, además se engrosaba la pared celular y se acumulaban gránulos de almidón distribuidos por toda la célula.

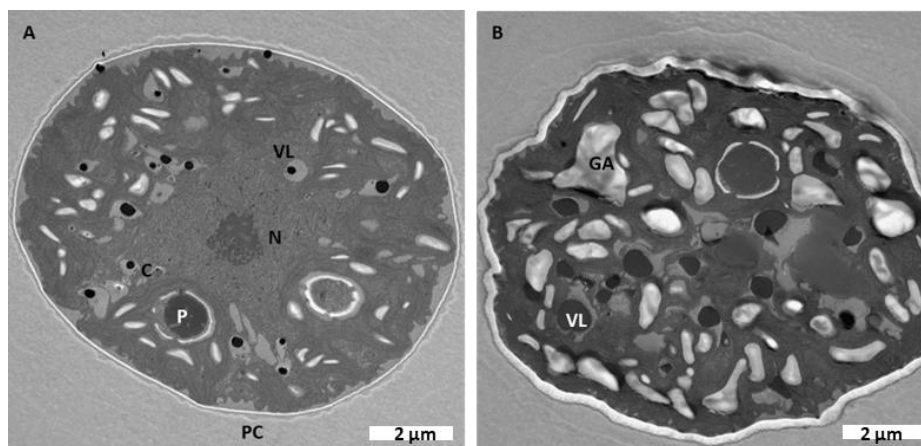


Figura 32. Ultraestructura de *Haematococcus pluvialis* sin acumulación de astaxantina (15 mM de nitrato) (A) y con acumulación de astaxantina (2 mM de nitrato) (B). N, núcleo; C, cloroplasto; P, pirenoide; PC, pared celular; GA, gránulo de almidón; VL, vesícula lipídica. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30.

En la Figura 33 se muestra una sección aumentada de ambas células observándose en detalle los gránulos de almidón y la estructura de las membranas fotosintéticas que en ambos casos permanecían ensambladas. Además, se observaba un engrosamiento de la pared celular con la consecuente desaparición de la envuelta cristalina tripartita y la disminución de la matriz extracelular en las células rojizas.

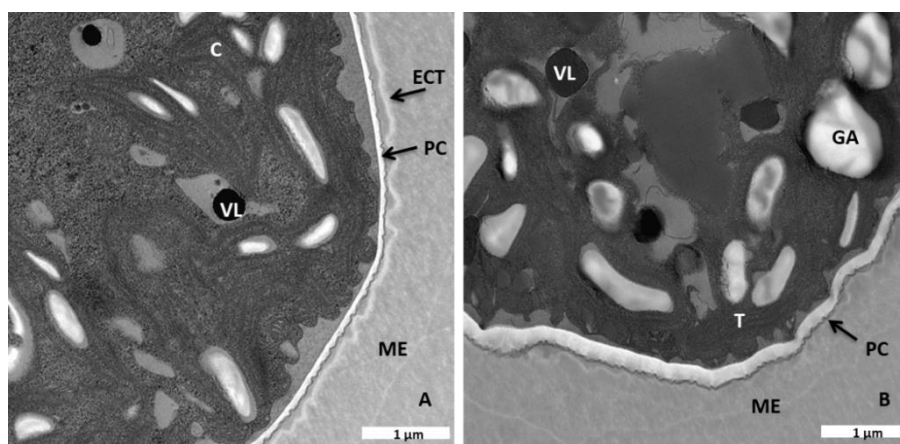


Figura 33. Detalle de la ultraestructura de *Haematococcus pluvialis* sin acumulación de astaxantina (A) y con acumulación de astaxantina (B). C, cloroplasto; T, tilacoide; GA, gránulo de almidón; VL, vesícula lipídica; ECT, envuelta cristalina tripartita; PC, pared celular; ME, matriz extracelular. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30.

La observación microscópica de los cultivos en días consecutivos puso de manifiesto que, en suficiencia de nitrato no se producían cambios morfológicos, mientras que en los cultivos en limitación se modificaba el tamaño de las células.

Se realizó un estudio más detallado con observaciones a distintas horas del día (Figura 34) (ZT₂, 950 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$; ZT₆, 2000 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$; ZT₁₀, 1050 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y ZT₁₈, oscuridad) (ver apartado 2.8 Materiales y Métodos) cuantificando peso seco y observando la morfología. No se registraron cambios en el peso seco de ambos cultivos a lo largo del día ni en días consecutivos. Respecto a la morfología, el cultivo en suficiencia estaba compuesto por una mezcla de flageladas y, mayoritariamente, palmeloides verdes durante todo el ciclo (Figura 34 A, B y C). Sin embargo, en el cultivo con limitación de nitrato, se modificaba el tamaño de las células (Figura 34 E, F y G) que aumentaba a medida que progresaba el ciclo de iluminación. En ambos cultivos, durante el periodo de oscuridad, se formaban sacos de células (verdes en suficiencia, rojizas en limitación) (Figura 34 D y H) que liberaban su contenido al comenzar un nuevo ciclo de iluminación.

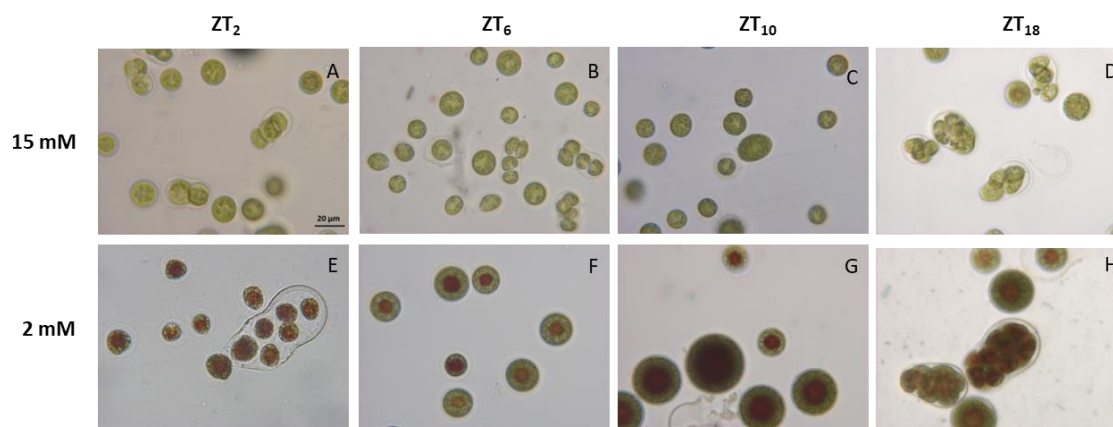


Figura 34. Evolución de un cultivo sin acumulación de astaxantina (A, B, C y D) y con acumulación de astaxantina (E, F, G y H) de *Haematococcus pluvialis* durante el ciclo solar simulado. A y E: 2 horas desde el inicio del periodo de iluminación; B y F: 6 horas; C y G: 10 horas; D y H: 18 horas. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Barra de tamaño 20 μm igual para todas las imágenes. ZT: “Zero Time”.

Para analizar la correlación entre cambios morfológicos y contenido en astaxantina, se compararon resultados de citometría de flujo con los de microscopía



óptica aplicados a cultivos en suficiencia de nitrato y limitación durante 24 horas. Las muestras se tomaron cada 2 horas y se fijaron para su análisis posterior.

En los registros del citómetro de flujo la posición del pico en el eje de abscisas respecto al origen indicaba el tamaño celular (en unidades relativas), de forma que cuanto más grandes eran las células, más se desplazaba a la derecha el pico. La geometría del pico determinaba el grado de homogeneidad de la muestra. Picos estrechos y definidos indicarían poblaciones homogéneas constituidas por células del mismo tamaño.

La Figura 35 muestra el estudio de citometría del cultivo en suficiencia de nitrato donde no se observaba cambios de tamaño de las células durante el ciclo de iluminación (el pico se mantenía en la misma posición respecto al origen).

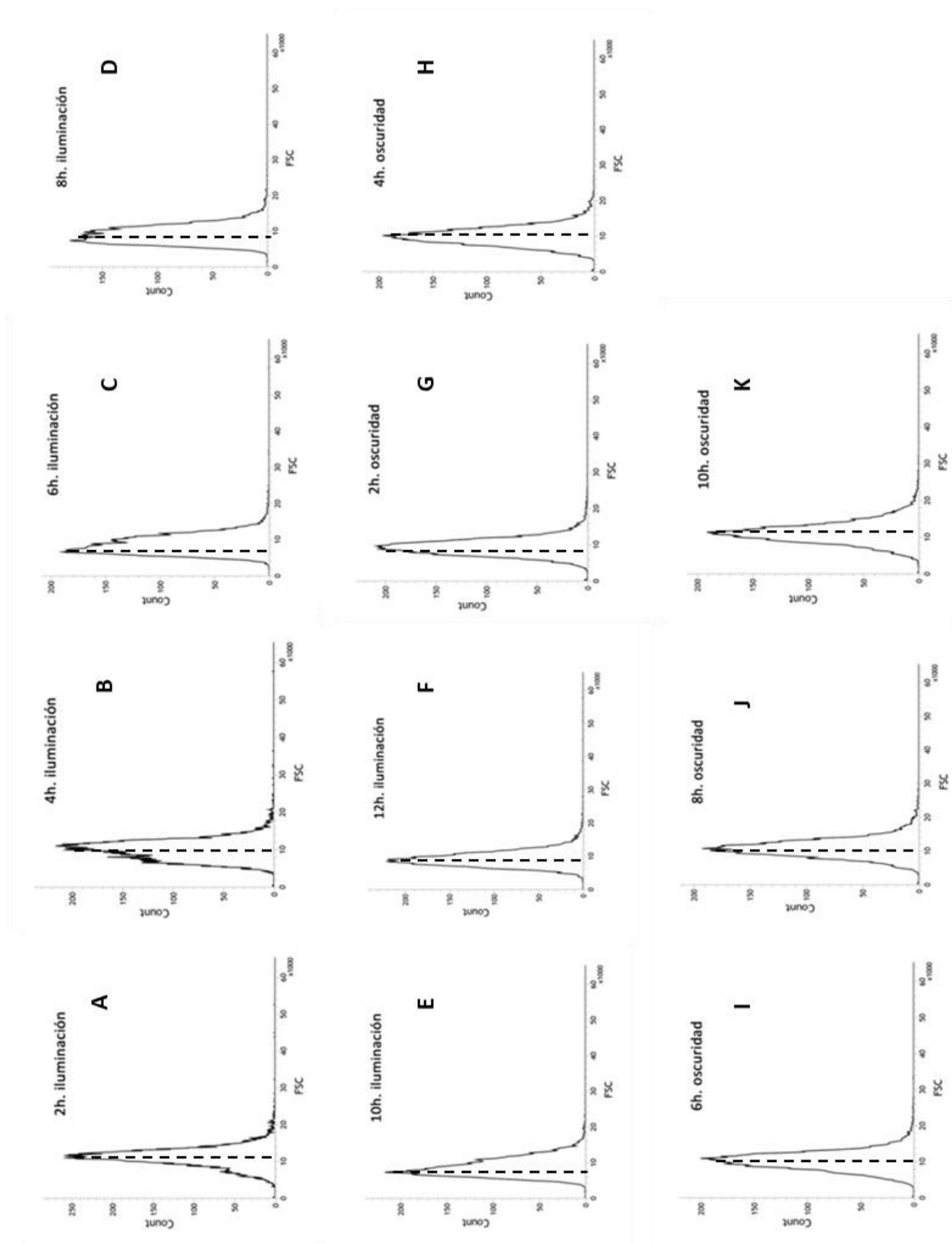


Figura 35. Análisis mediante citometría de flujo de la evolución de un cultivo de *Haematococcus pluvialis* sin acumulación de astaxantina (15 mM de nitrato) a lo largo del ciclo solar simulado. FSC (eje X): Tamaño celular. Count (eje Y): número de eventos. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30.



Estos resultados se correspondían con la observación microscópica (Figura 36). El cultivo crecido en suficiencia de nitrato estaba constituido por una población de tamaño homogéneo. Sólo al final del periodo de oscuridad (Figura 36 K y L) y al comienzo de la iluminación (Figura 36 A) se formaban pequeños sacos que desaparecían con la luz.

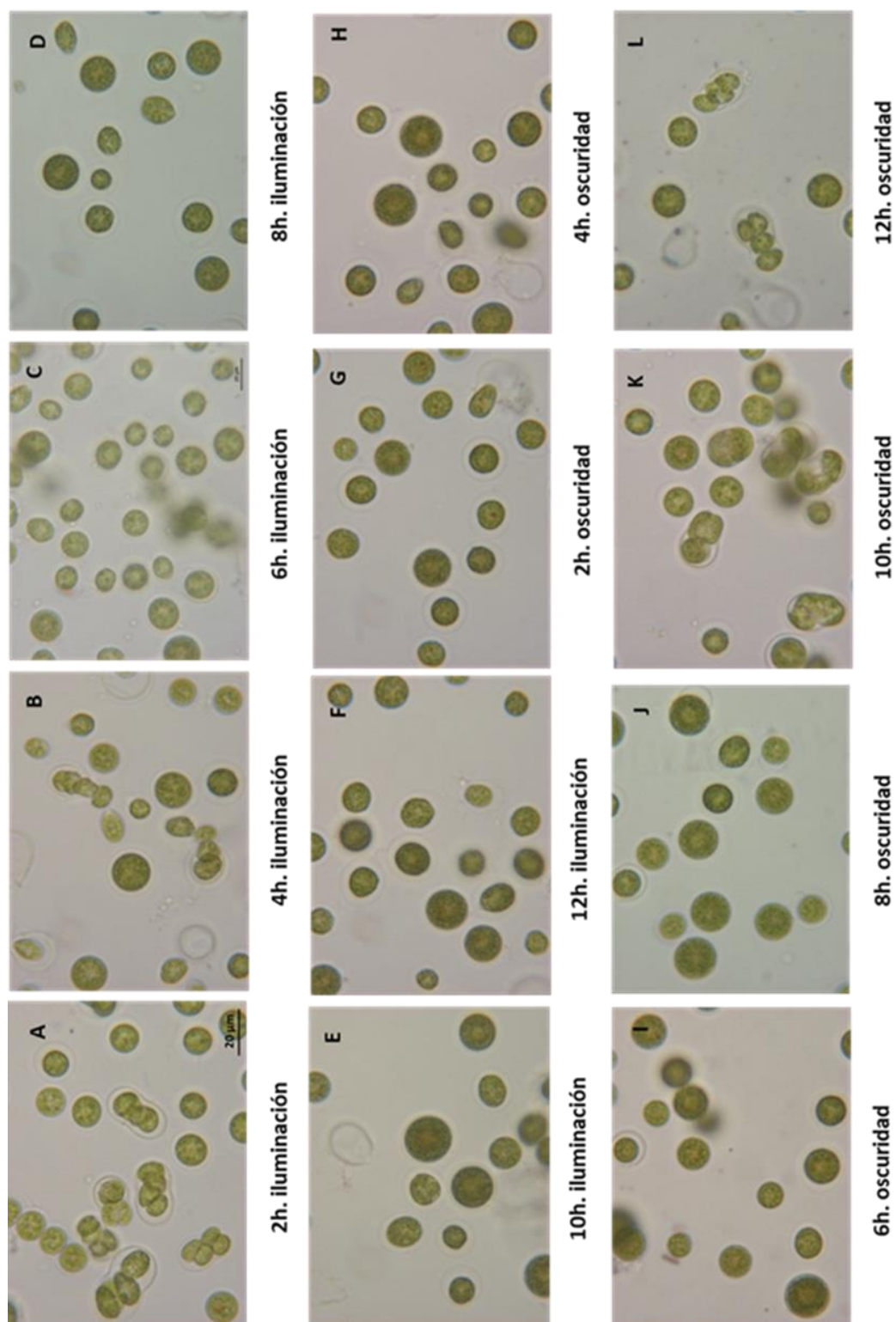


Figura 36. Análisis mediante microscopía óptica de la evolución de la morfología celular de un cultivo *Haematococcus pluvialis* sin acumulación de astaxantina (15 mM de nitrato) a lo largo del ciclo solar simulado. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Barra de tamaño 20 µm igual para todas las imágenes



En el análisis de citometría de flujo (Figura 37), se observaba mayor variabilidad en el cultivo en limitación. En estas gráficas se ha separado por colores la representanci3n de células de distinto tamaño para facilitar su visualizaci3n, de manera que el pico rojo corresponde a células pequeñas, el verde a células de tamaño mediano y el azul al tamaño grande.

El comienzo del periodo de iluminaci3n marcaba la aparici3n de dos poblaciones bien diferenciadas respecto a tamaño (Figura 37 A). La línea vertical azul en el margen derecho correspondía a células de gran tamaño fuera del rango de detecci3n. Transcurridas 4 horas de luz, la poblaci3n estaba constituida casi exclusivamente por células de pequeño tamaño (Figura 37 B, trazo rojo) y la línea vertical derecha desaparecía. Según progresaba el ciclo de iluminaci3n, la poblaci3n de pequeño tamaño iba reduciéndose y aparecían células de mayor tamaño (Figura 37 C-F, trazo verde). En oscuridad, la poblaci3n estaba constituida por células de tamaño mediano y aumentando progresivamente la presencia de grandes (fuera del rango de detecci3n), evidenciada por la línea azul vertical (Figura 37 H-K).

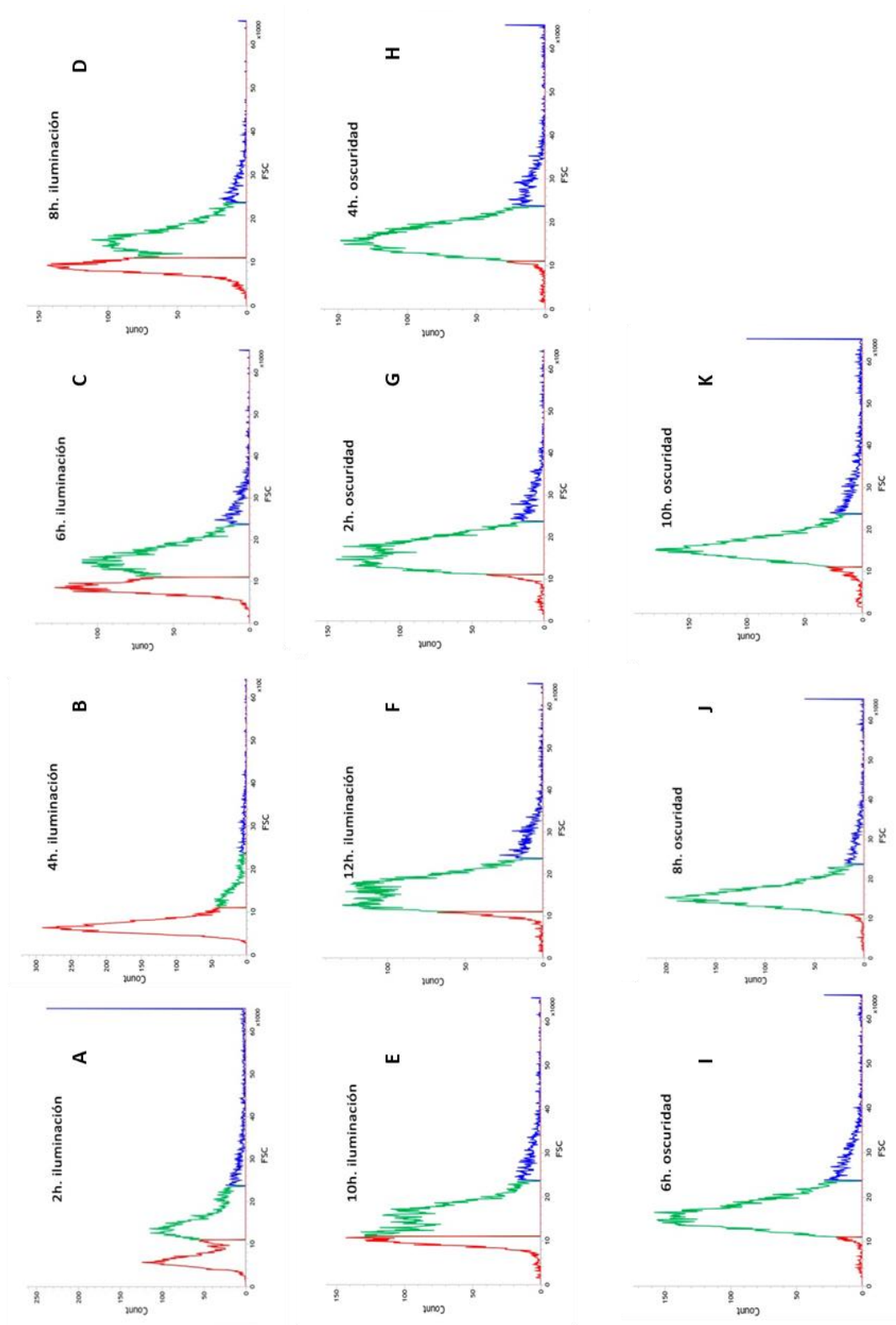


Figura 37. Análisis mediante citometría de flujo de la evolución de un cultivo de *Haematococcus pluvialis* con acumulación de astaxantina (2 mM de nitrato) a lo largo del ciclo solar simulado. FSC (eje X): Tamaño celular. Count (eje Y): número de eventos. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30.



Comparando esta distribución con la observación microscópica (Figura 38), el pico rojo podría relacionarse con células flageladas y palmeloides pequeñas, el pico verde a células palmeloides de tamaño medio y el pico azul con células grandes, (palmeloides en un grado avanzado de madurez o incluso sacos de células). Al comienzo del periodo de iluminación, la población estaba compuesta casi exclusivamente por sacos de células rojizas, posiblemente asociados a la aparición de la línea vertical azul, y algunas flageladas y palmeloides rojizas de pequeño tamaño libres que podrían corresponder con los picos rojo y verde respectivamente (Figura 38 A). Transcurridas 4 horas de iluminación, los sacos habían desaparecido y todas las células flageladas rojizas estaban libres (Figura 38 B) lo que se correspondía con la desaparición de la línea azul vertical y la aparición del pico rojo. A las 6 horas, la población era bastante heterogénea en cuanto a tamaño y siguió evolucionando hacia células palmeloides de mayor tamaño (Figura 38 C-F). Al finalizar el periodo de iluminación, había palmeloides de distintos tamaños, algunas hasta 40 μm . A medida que progresaba el periodo de oscuridad (a partir de 8 horas), estas células palmeloides de gran tamaño comenzaban a adoptar una forma ovoide de tamaño entre 45 – 50 μm (Figura 38 H-J) previa a la formación de sacos de células con al menos 12 células, constituyendo la población al final del periodo de oscuridad (línea vertical azul) (Figura 38 K y L).

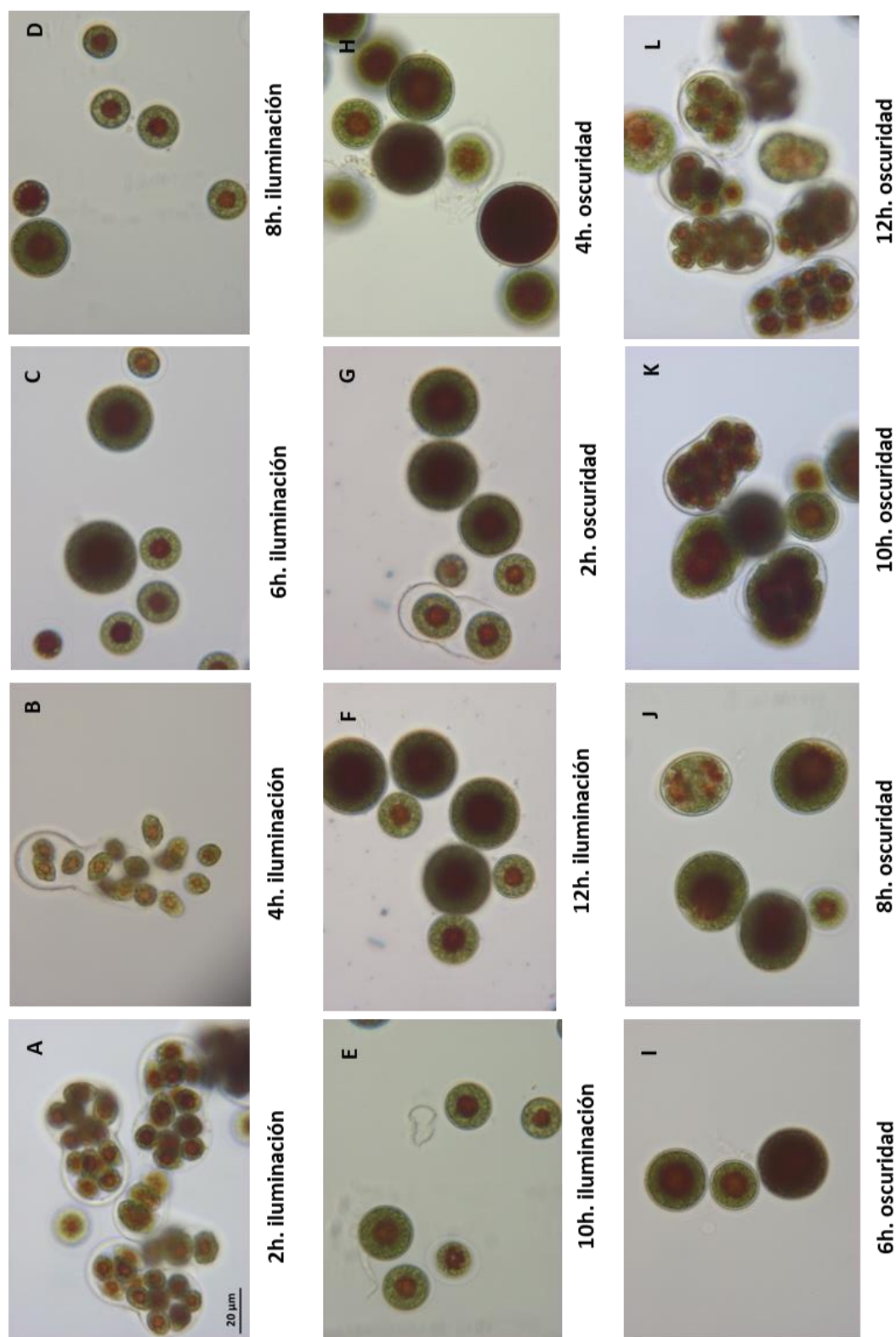


Figura 38. Análisis mediante microscopía óptica de la evolución de la morfología celular de un cultivo *Haematococcus pluvialis* con acumulación de astaxantina (2 mM de nitrato) a lo largo del ciclo solar simulado. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Barra de tamaño 20 μm igual para todas las imágenes.

El porcentaje de células de cada tamaño en función del ciclo solar se representa en la Figura 39. Se contabilizaron 10.000 células (100 %) (eje Y). En cultivos en suficiencia de nitrato, la población era homogénea: las células de tamaño pequeño estaban presentes a lo largo del periodo de iluminación mientras que las de tamaño mediano se observaban en la oscuridad. Sin embargo, en cultivos en limitación de nitrato, se evidenciaba la presencia de tres poblaciones que cambiaban en porcentaje durante el ciclo solar. Las células de tamaño pequeño (marcadas en rojo) aumentaban su porcentaje, pasando de un 25% al inicio del periodo de iluminación, hasta alcanzar un 70 % transcurridas 4 horas. Esto podría corresponderse con la liberación de células del interior de los sacos. A partir de ese momento, la población estaba compuesta por células pequeñas y medianas en similar proporción, hasta el final del periodo de iluminación. Esto podría explicarse por el incremento de tamaño a medida que se registró acumulación de astaxantina. Las células pequeñas desaparecían en oscuridad con un incremento en el porcentaje de células de tamaño mediano (marcadas en verde), pasando de un 33 % a las 2 horas de oscuridad, hasta alcanzar un 85 % al final del periodo previo a la formación de sacos. La población de mayor tamaño (marcada en azul) estaba presente durante todo el ciclo y de forma más evidente al final de la oscuridad e inicio del periodo de iluminación (a las 2 horas). No se incluyeron en el análisis las células que estaban fuera de rango de detección (línea vertical azul de la Figura 37).

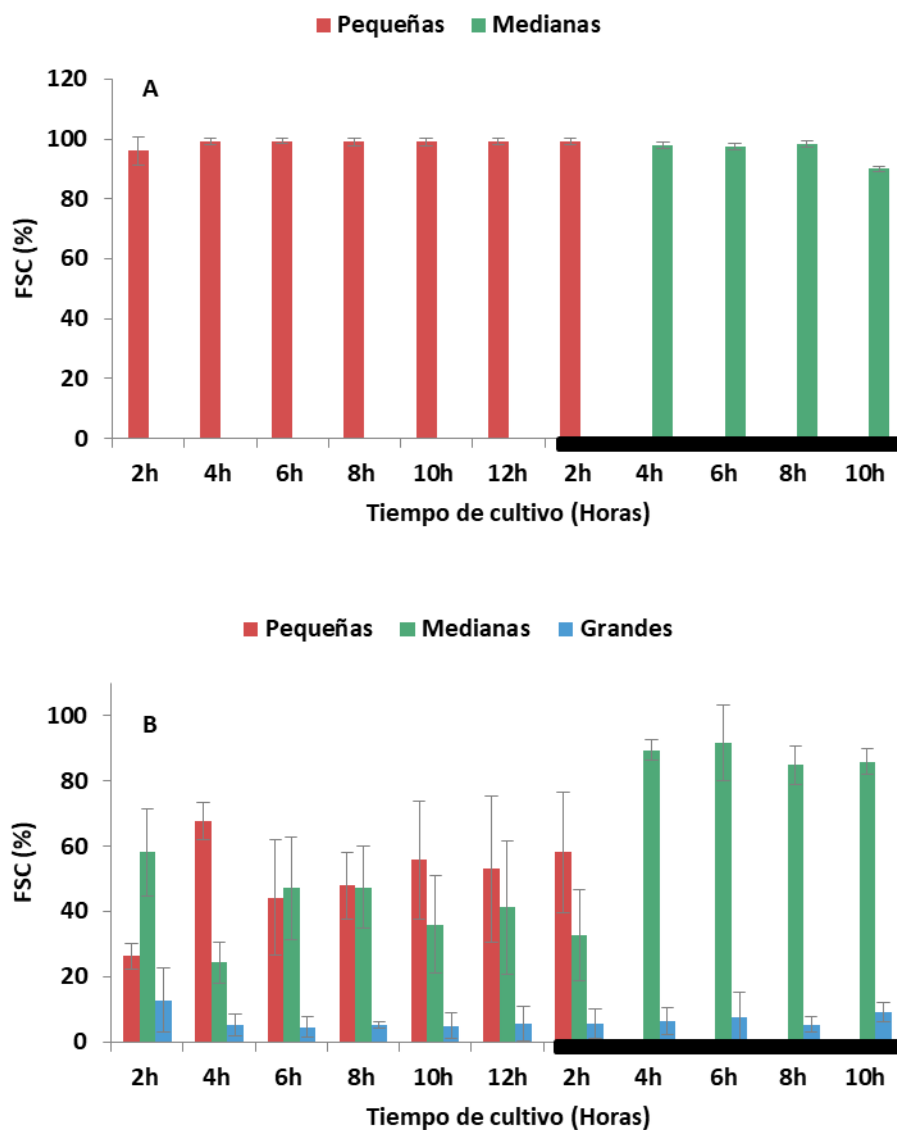


Figura 39. Distribución del tamaño (% FSC) de células de *Haematococcus pluvialis* sin acumulación (**A**) y con acumulación de astaxantina (**B**) en función del ciclo solar. Barra negra en el eje de abscisas indicativa del periodo de oscuridad. Pequeñas (<20 μm); Medianas (20 – 45 μm); Grandes (>45 μm).

3.3.2 METABOLÓMICA EN EL PERIODO DE ILUMINACIÓN

Se determinaron el crecimiento y contenido en nitrógeno de la biomasa (ver Anexo Tabla A.3), además del contenido en carotenoides, ácidos orgánicos, aminoácidos, ácidos grasos, azúcares y parámetros fotosintéticos. Las muestras se tomaron transcurridas 6 horas desde el comienzo del periodo de iluminación en cultivos que acumulaban astaxantina (2 mM de nitrato) y que no acumulaban (15 mM de nitrato). Los valores son promedio de cuatro experimentos diferentes, cada uno formado por 2 cultivos control (n=8) y 4 cultivos en limitación de nitrato (n=16).

3.3.2.1 Carotenoides

El contenido en carotenoides de la biomasa obtenida de cultivos con distinto nivel de acumulación de astaxantina se muestra en la Tabla 8.

En limitación nitrogenada (palmeloides rojizas), el contenido total de carotenoides aumentó en un 44 % (pasando de 0,25 % a 0,36 % en la biomasa) respecto al cultivo verde, debido al incremento en astaxantina, que se multiplicó x 15, y en menor medida a cantaxantina. Los demás pigmentos disminuyeron, especialmente β -caroteno y luteína.

Tabla 8. Contenido en carotenoides (expresado como % en la biomasa) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Se muestra el error estándar para n=8 en el caso de los cultivos en suficiencia (15 mM) y n=16 para los cultivos en limitación de nitrato (2 mM). Las diferencias son significativas para $p < 0,05$.

	15 mM (% biomasa)	2mM	% variación
Violaxantina	0,045 ± 0,004	0,027 ± 0,002	-40
Astaxantina	0,014 ± 0,002	0,208 ± 0,036	1385,7
Luteína	0,129 ± 0,008	0,071 ± 0,003	-45
Cantaxantina	0,001 ± 0,000	0,009 ± 0,002	800
α-caroteno	0,003 ± 0,000	N.D.*	-
β-caroteno	0,050 ± 0,004	0,022 ± 0,001	-56

*N.D: no detectado

3.3.2.2 Ácidos grasos

En los cultivos sin acumulación de astaxantina el contenido en ácidos grasos era del 4,92 % de la biomasa; mientras que, en los que se estaba acumulando astaxantina era significativamente superior, constituyendo un 6,53 % de la biomasa.

La Tabla 9 muestra el perfil de ácidos grasos como porcentaje del total. Existían diferencias significativas en ambos tipos celulares para el ácido palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3n4). El ácido palmitoleico bajaba casi un 50 % en células rojizas y el linolénico un 30 %. Sin embargo, el ácido oleico y el linoleico experimentaron una subida del 38 % y del 28 %, respectivamente. El resto de ácidos grasos detectados no mostraron diferencias significativas entre los dos cultivos.

Tabla 9. Perfil de ácidos grasos (expresado como % del total de AG) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Se muestra el error estándar para n=8 en el caso de los cultivos en suficiencia (15 mM) y n=16 para los cultivos en limitación de nitrato (2 mM). Los ácidos grasos destacados en negrita mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$).

	15 mM (% total AG)	2mM	% variación
Mirístico (C14:0)	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	- 12,5
Palmítico (C16:0)	17,52 ± 0,39	15,89 ± 1,27	- 9,3
Palmitoleico (C16:1)	2,25 ± 0,14	1,17 ± 0,04	- 48
Esteárico (C18:0)	5,49 ± 0,35	4,94 ± 0,32	- 10
Oleico (C18:1)	15,81 ± 0,36	21,89 ± 2,33	38,5
Linoleico (C18:2)	13,03 ± 0,44	16,66 ± 0,68	27,8
Linolénico (C18:3n4)	20,60 ± 0,55	14,47 ± 0,44	- 29,8
Araquidónico (C20:6n4)	1,53 ± 0,12	1,37 ± 0,15	-10,5

3.3.2.3 Aminoácidos libres

En la Tabla 10 se muestra el contenido en aminoácidos para los dos tipos celulares estudiados. En ambos casos, el ácido glutámico era el aminoácido más abundante seguido de la alanina. Sólo se observaron diferencias significativas en el contenido en ácido glutámico y aspártico, asparragina, glutamina y alanina que eran menores en cultivos que acumulaban astaxantina. La histidina aparece al mismo tiempo de retención que el GABA. Se ha descrito (Recht et al. 2014) que en limitación nitrogenada el contenido en GABA se incrementaba respecto a la situación control. Por tanto, no es posible afirmar que el aumento en el pico correspondiente a histidina se deba a un aumento de este aminoácido, de GABA o a la suma de ambos.

Tabla 10. Contenido en aminoácidos libres (expresado como nanomoles/mg biomasa) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Se muestra el error estándar para n=8 en el caso de los cultivos en suficiencia (15 mM) y n=16 para los cultivos en limitación de nitrato (2 mM). Los aminoácidos destacados en negrita mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$).

	15 mM (nanomoles/mg biomasa)	2 mM	% variación
Ac. aspártico	2,24 ± 0,24	0,77 ± 0,17	-65,6
Ac. glutámico	12,11 ± 0,48	8,04 ± 0,54	-33,6
Serina	1,19 ± 0,15	1,34 ± 0,13	12,6
Asparagina	0,66 ± 0,07	0,46 ± 0,05	-30
Glicina	0,79 ± 0,13	0,62 ± 0,09	-21,5
Glutamina	1,44 ± 0,17	0,81 ± 0,16	-43,7
Histidina*	0,10 ± 0,05	0,40 ± 0,20	300
Treonina**	1,99 ± 0,56	1,59 ± 0,17	-20,1
Alanina	4,81 ± 0,97	2,30 ± 0,31	-52,2
Arginina	1,39 ± 0,23	1,76 ± 0,40	26,6
Prolina	0,71 ± 0,09	0,60 ± 0,08	-15,5
Tirosina	0,03 ± 0,02	0,09 ± 0,02	200
Valina	0,70 ± 0,22	0,59 ± 0,11	-15,7
Metionina	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,05	10
Cisteína	0,49 ± 0,15	0,35 ± 0,05	-28,5
Isoleucina	0,30 ± 0,11	0,21 ± 0,05	-30
Leucina	0,27 ± 0,07	0,21 ± 0,05	-22,2
Fenilalanina	0,13 ± 0,03	0,14 ± 0,03	7,7
Triptófano	0,36 ± 0,10	0,23 ± 0,05	-36
Lisina	0,38 ± 0,07	0,33 ± 0,05	-13,2

*Problema en la integración del pico de histidina por solapamiento con GABA.

** Problema en la integración del pico de treonina por solapamiento con residuos de la derivatización.

3.3.2.4 Ácidos orgánicos

El contenido en intermediarios del *Ciclo del Ácido Cítrico* en cultivos con y sin acumulación de astaxantina se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Contenido en ácidos orgánicos (expresado como nanomoles por mg de biomasa) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Se muestra el error estándar para n=8 en el caso de los cultivos en suficiencia (15 mM) y n=16 para los cultivos en limitación de nitrato (2 mM). Las diferencias son significativas para $p < 0,05$.

	15 mM (nanomol/mg biomasa)	2 mM	% variación
Piruvato & Oxaloacetato	$0,96 \pm 0,10$	$0,55 \pm 0,06$	- 42,7
Succinato	$1,53 \pm 0,07$	$1,21 \pm 0,07$	- 20,9
Fumarato	$0,62 \pm 0,21$	$0,28 \pm 0,05$	- 54,8
Malato	$5,78 \pm 0,20$	$2,88 \pm 0,11$	- 50,1
α -cetoglutarato	$0,45 \pm 0,13$	$0,17 \pm 0,03$	- 62,2
Citrato	$1,59 \pm 0,10$	$1,98 \pm 0,14$	24,5

Las células rojizas tenían un menor contenido de ácidos orgánicos excepto citrato, que subía un 25 %. Los cambios más significativos afectaban al α -cetoglutarato, fumarato y malato que disminuían un 62, 55 y 50 % respectivamente en relación al control sin astaxantina.

3.3.2.5 Azúcares

El análisis de azúcares (Tabla 12) evidenció un incremento en más de tres veces en el contenido en sacarosa y de 1,5 veces en el de glucosa y fructosa en células rojizas. El resto de azúcares no mostraban diferencias significativas entre los dos tipos celulares ($p < 0,05$).

Tabla 12. Contenido en azúcares (expresado como nanomoles por mg de biomasa) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Se muestra el error estándar para n=8 en el caso de los cultivos en suficiencia (15 mM) y n=16 para los cultivos en limitación de nitrato (2 mM). Los azúcares destacados en negrita mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$).

	15 mM (nanomol/mg biomasa)	2 mM	% variación
Fructosa	0,08 ± 0,02	0,12 ± 0,03	50
Galactosa	1,94 ± 0,25	2,07 ± 0,41	6,7
Glucosa	0,12 ± 0,01	0,18 ± 0,02	50
Sacarosa	18,83 ± 3,08	66,52 ± 8,17	253,2
Trehalosa	0,42 ± 0,05	0,25 ± 0,03	- 40,4

3.3.2.6 Parámetros fotosintéticos

La eficiencia fotosintética en ambos tipos celulares, se determinó mediante la fluorescencia de la clorofila.

Respecto al transporte de electrones del fotosistema II (ETR (II)), a intensidades de luz crecientes (Figura 40 A), los cultivos con y sin acumulación de astaxantina mostraron la misma tendencia pero alcanzando niveles diferentes (por ejemplo, para cultivos verdes la máxima capacidad de transporte de electrones es un 75 % y para cultivos con acumulación un 54 %). A baja irradiancia ($10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), el comportamiento de ambos cultivos era similar. Al aumentar la irradiancia el transporte de electrones era diferente en ambos cultivos. La máxima diferencia se registraba a $500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y se mantenía a irradiancias mayores. Los cultivos que acumulaban astaxantina tenían reducido el transporte electrónico en un 30 %. En consecuencia, el rendimiento del PS II (Y(II)) en cultivos que acumulaban astaxantina era menor (Figura 40 B) y la disipación de energía no absorbida en forma de calor (NPQ) era superior (Figura 40 C).

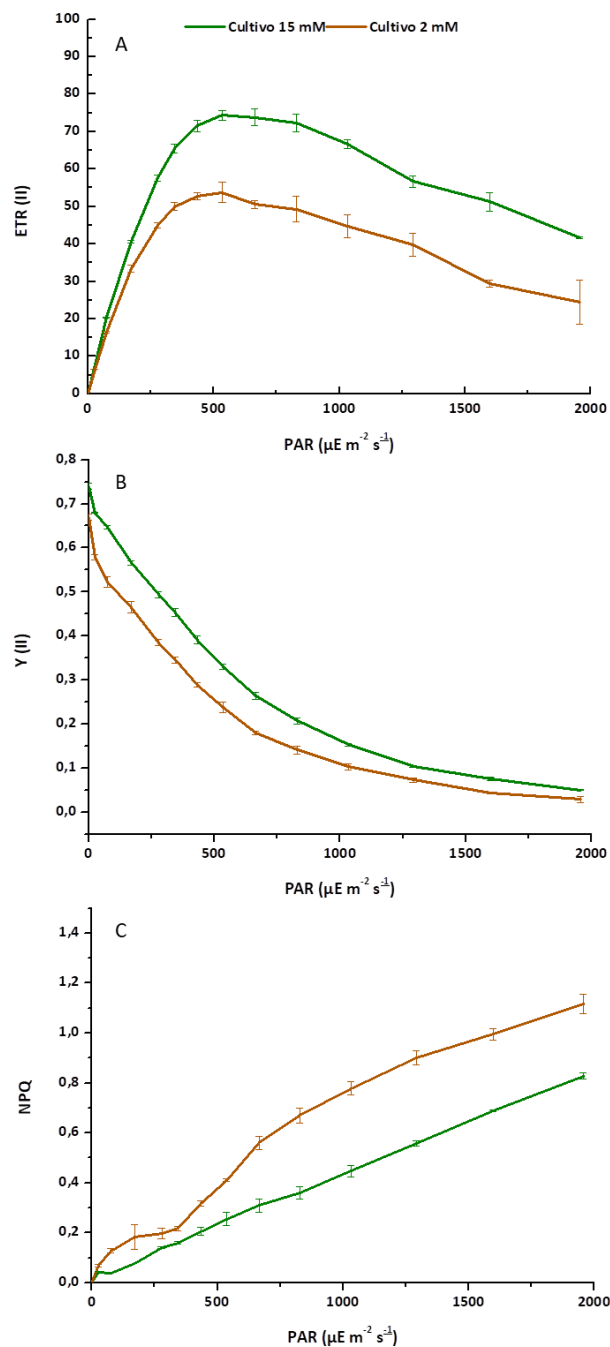


Figura 40. Parámetros fotosintéticos a distintas intensidades lumínicas en muestras de cultivos de *Haematococcus pluvialis* sin acumulación (suficiencia de nitrógeno, 15 mM) y con acumulación de astaxantina (limitación de nitrógeno, 2 mM). **A:** tasa fotosintética de transporte de electrones del fotosistema II (ETR (II)); **B:** rendimiento cuántico del fotosistema II (Y (II)); **C:** energía disipada no fotoquímica (NPQ); PAR: radiación fotosintéticamente activa. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Se muestra el error estándar para n=2.

Los parámetros fotosintéticos y eficiencia fotosintética (F_v/F_m) en cultivos de *Haematococcus pluvialis* con y sin acumulación de astaxantina a una irradiancia de $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, (promedio de la que están recibiendo los cultivos) se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Parámetros fotosintéticos para una irradiancia PAR de $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. **ETR**: tasa fotosintética de transporte de electrones del PSII; **Y (II)**: rendimiento del PSII; **NPQ**: disipación de calor; **F_v/F_m** : eficiencia fotosintética. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Las diferencias son significativas para $p < 0,05$.

	15 mM	2 mM
ETR	$66,65 \pm 1,24$	$44,80 \pm 3,09$
Y (II)	$0,15 \pm 0,00$	$0,10 \pm 0,01$
NPQ	$0,45 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,03$
F_v/F_m	$0,74 \pm 0,01$	$0,67 \pm 0,00$

En cultivos que acumulan astaxantina, la eficiencia fotosintética era un 10 % menor, con una disminución de la tasa de transporte de electrones y del rendimiento del fotosistema II del 33 %. En estos cultivos, la energía disipada en forma de calor era un 73 % mayor.

3.3.3 METABOLÓMICA EN EL PERIODO DE OSCURIDAD

Para completar el estudio durante el ciclo solar simulado, se realizó una caracterización bioquímica en el periodo de oscuridad. El muestreo se realizó transcurridas 4 horas desde el comienzo de la oscuridad.

3.3.3.1 Carotenoides

El contenido total de carotenoides era mayor en los cultivos que acumulaban astaxantina (0,35 % de la biomasa) que en el control (0,23 %) (Tabla 14), fundamentalmente debido al contenido en astaxantina (x 16) y cantaxantina (x 4) mientras que el contenido en los demás carotenoides se redujo. Estos resultados eran similares a los obtenidos en el periodo de luz (Tabla 8). **Tabla 14.** Contenido en carotenoides (expresado como % en la biomasa) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de oscuridad. Se muestran valores de error estándar para n=4. Las diferencias son significativas para $p < 0,05$.

	15 mM (% biomasa)	2mM	% variación
Violaxantina	0,041 ± 0,001	0,025 ± 0,002	-39
Astaxantina	0,013 ± 0,001	0,210 ± 0,020	1515,4
Luteína	0,128 ± 0,003	0,077 ± 0,005	-40
Cantaxantina	0,003 ± 0,000	0,012 ± 0,001	300
α-caroteno	0,003 ± 0,002	0,001 ± 0,000	-66,7
β-caroteno	0,046 ± 0,002	0,028 ± 0,002	-39,1

3.3.3.2 Ácidos grasos

El contenido total de ácidos grasos era mayor en cultivos que acumulaban astaxantina (5 % de la biomasa) respecto al control (4,2 %) (Tabla 15). El ácido oleico subía un 42 % y también lo hacían el ácido palmítico y esteárico en un 12 y 22 % respectivamente, bajando el contenido en ácido mirístico, linolénico y araquidónico.

De nuevo, estos resultados eran similares a los recogidos en el periodo de iluminación (Tabla 9).

Tabla 15. Perfil de ácidos grasos (expresado como % del total de AG) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de oscuridad. Se muestran valores de error estándar para n=4. Los ácidos grasos destacados en negrita mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$).

	15 mM	2mM	% variación
	(% total AG)		
Mirístico (C14:0)	0,20 ± 0,01	0,13 ± 0,00	- 35
Palmitico (C16:0)	16,01 ± 0,12	17,90 ± 0,03	11,8
Palmitoleico (C16:1)	1,33 ± 0,07	0,98 ± 0,04	- 26,3
Esteárico (C18:0)	4,03 ± 0,14	4,91 ± 0,49	21,8
Oleico (C18:1)	13,23 ± 0,40	18,84 ± 0,79	42,4
Linoleico (C18:2)	19,27 ± 1,68	19,23 ± 0,59	- 0,2
Linolénico (C18:3n4)	16,07 ± 0,73	12,79 ± 0,53	- 20,4
Araquidónico C20:6n4	2,05 ± 0,03	1,38 ± 0,31	- 32,6

3.3.3.3 Aminoácidos libres

En la Tabla 16 se muestra el perfil de aminoácidos libres de ambos cultivos en el periodo de oscuridad. Sólo se observaron diferencias significativas en el contenido en serina, glicina, glutamina y alanina que eran menores en cultivos que acumulaban astaxantina.

Tabla 16. Contenido en aminoácidos libres (expresado como nanomoles/mg biomasa) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de oscuridad. Se muestran valores de error estándar para n=4. Los aminoácidos destacados en negrita mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$).

	15 mM (nanomoles/mg biomasa)	2 mM	% variación
Ac. aspártico	0,93 ± 0,09	0,87 ± 0,07	-6,5
Ac. glutámico	12,67 ± 0,55	11,67 ± 0,60	-14,7
Serina	1,15 ± 0,05	0,81 ± 0,03	-29,6
Asparagina	2,66 ± 0,62	1,36 ± 0,16	-42,8
Glicina	0,59 ± 0,06	0,31 ± 0,04	-47,4
Glutamina	0,26 ± 0,04	0,14 ± 0,00	-46,1
Histidina**	1,09 ± 0,04	0,95 ± 0,10	-8,6
Treonina***	2,73 ± 0,19	2,32 ± 0,07	-15
Alanina	5,26 ± 0,30	3,59 ± 0,20	-31,7
Arginina	2,61 ± 0,19	2,97 ± 0,19	13,8
Prolina	0,60 ± 0,06	0,57 ± 0,05	-5
Tirosina	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,02	-8,3
Valina	0,67 ± 0,05	0,63 ± 0,05	-6
Metionina	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01	25
Cisteína*	N.D	N.D	-
Isoleucina	0,24 ± 0,04	0,15 ± 0,01	-37,7
Leucina	0,76 ± 0,08	0,60 ± 0,02	-21
Fenilalanina	0,40 ± 0,09	0,30 ± 0,02	-25
Triptófano*	N.D	N.D	--
Lisina*	N.D	N.D	--

* No detectado

** Problema en la integración del pico de histidina por solapamiento con GABA.

*** Problema en la integración del pico de treonina por solapamiento con residuos de la derivatización.

3.3.3.4 Ácidos orgánicos

En oscuridad no se detectaron piruvato, oxalacetato, succinato y fumarato (Tabla 17). Sin embargo, el contenido en citrato y α -cetoglutarato en los cultivos con astaxantina era un 74 % y 18 % mayor respectivamente, mientras que el malato no cambiaba (Tabla 11).

Tabla 17. Contenido en ácidos orgánicos (expresado como nmol por mg de biomasa) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de oscuridad. Se muestran valores de error estándar para n=4. Los ácidos orgánicos destacados en negrita mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$).

	15 mM (nanomol/mg biomasa)	2 mM	% variación
Piruvato & Oxaloacetato	N.D.	N.D.	--
Succinato	N.D.	N.D.	--
Fumarato	N.D.	N.D.	--
Malato	4,44 \pm 0,37	3,97 \pm 0,24	- 10,6
α-cetoglutarato	0,62 \pm 0,02	0,73 \pm 0,03	17,8
Citrato	1,73 \pm 0,08	3,01 \pm 0,50	74

N.D: no detectado

3.3.3.5 Azúcares

El perfil de azúcares se muestra en la Tabla 18, con un menor contenido en fructosa y glucosa (3 y 2 veces respectivamente) y mayor en sacarosa (1,5 veces) en los cultivos que acumulaban astaxantina. Este comportamiento difería de lo observado durante el periodo de iluminación (Tabla 12).

Tabla 18. Contenido en azúcares (expresado como nmol/mg de biomasa) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de oscuridad. Se muestran valores de error estándar para n=4. Los azúcares destacados en negrita mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$).

	15 mM (nanomol/mg biomasa)	2 mM	% variación
Fructosa	0,98 ± 0,27	0,31 ± 0,09	- 68,3
Galactosa	2,58 ± 0,44	2,79 ± 0,30	8,1
Glucosa	0,91 ± 0,24	0,43 ± 0,06	- 52,7
Sacarosa	47,40 ± 5,21	71,19 ± 7,18	50,2
Trehalosa	0,15 ± 0,04	0,17 ± 0,03	13,3

DISCUSIÓN



La astaxantina es un pigmento ampliamente utilizado en acuicultura, en cosmética y en la industria alimentaria, con actividad antioxidante notablemente superior a la de otros carotenoides. El mercado mundial de astaxantina actualmente está dominado por la astaxantina sintética con precios de mercado de 2.000 dólares por kg (Nguyen 2013) y aplicación preferencial como pigmento acuícola. Se estima que en 2022 el mercado de la astaxantina superará los 426,9 millones de dólares (Industry Experts, 2015).

La astaxantina sintética contiene una mezcla de isómeros 3S, 3'S; 3R, 3'S; y 3R, 3'R en proporción 1: 2: 1, a diferencia de la natural, donde predomina el isómero 3S, 3'S. Precisamente este isómero es el que confiere mayor grado de pigmentación (Han et al. 2013) y mayor capacidad antioxidante, de ahí su interés. Otra razón para utilizar astaxantina natural es la creciente preocupación por la seguridad alimentaria y sanitaria.

En las últimas décadas, el mercado nutracéutico y de alimentos funcionales ha experimentado un acelerado crecimiento, lo que supone una excelente oportunidad para la astaxantina natural, en general y para la obtenida a partir de *Haematococcus pluvialis*, en particular. Esta microalga desarrolla quistes de resistencia en respuesta a condiciones de estrés, tales como alta irradiancia y ausencia de nitrógeno, que pueden acumular más del 4% de este pigmento en su biomasa (Boussiba and Vonshak 1991; Boussiba 2000; Margalith 1999; Tjahjono et al. 1994).

La producción comercial de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* se ha visto limitada por razones fisiológicas y técnicas: tasa de crecimiento lenta, susceptibilidad a la contaminación por otras microalgas, amebas, hongos y protozoos, altos costos derivados del empleo de complejas infraestructuras para los sistemas producción en dos fases aplicados a escala industrial, etc. A pesar de estas limitaciones, la producción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis* es una realidad, con elevado precio de mercado de 7.000 dólares por kg (Nguyen 2013) justificados por la demanda como potente agente antioxidante natural (Lorenz and Cysewski 2000; Guerin et al. 2003). Para disminuir estos costos es necesario, entre otros aspectos, optimizar la

producción, determinando los factores que favorecen la acumulación del pigmento. Existen multitud de estudios a este respecto, todos ellos realizado en sistemas de cultivo en estanco.

La utilización del cultivo continuo como aproximación experimental supone una valiosa herramienta al permitir el estudio de cada factor de forma individualizada, eliminando o reduciendo las interferencias a la hora de interpretar los resultados que se producen en los sistemas en estanco. Este tipo de cultivos permite el mantenimiento de estados de equilibrio donde todas las variables están controladas y las características de la población permanecen constantes. Cuando la velocidad específica de crecimiento iguala a la velocidad de dilución, se genera un estado estacionario a un determinado valor de densidad celular, compensándose la generación de células por crecimiento con la dilución producida por el aporte de medio fresco (Fernandes et al. 2015; Pirt 1980). Los cultivos continuos son especialmente adecuados para los estudios metabolómicos que requieren un conjunto de datos reproducibles, fiables y biológicamente homogéneos (Hoskisson and Hobbs 2005). La aplicación de estos cultivos donde destaca la constancia de parámetros (incluida la disponibilidad nutrientes) que ocurre durante el estado estacionario, es muy productiva en este sentido y ofrece ventajas para la adquisición de estos datos, prevaleciendo sobre sistemas en *batch* donde las diferencias, podrían estar enmascaradas por la cantidad de variables que se encuentran afectadas en estas circunstancias.

El cultivo continuo se ha aplicado con éxito a la producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*, utilizando la limitación moderada de nitrato como factor de estrés, ya que permite mantener poblaciones celulares en crecimiento activo a la vez que sintetizan astaxantina, alcanzándose elevadas productividades ($20 \text{ mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$) de este pigmento (Del Río et al. 2008). Esta metodología se ha probado a escala piloto (García-Malea et al. 2009).

En estudios recientes con *Haematococcus pluvialis* se han analizado los metabolitos alterados durante la síntesis de astaxantina (Recht et al. 2014; Su et al.



2014; Wang et al. 2004). En todos los casos se opera en régimen estanco y bajo la influencia de fuertes condiciones de estrés, como limitación severa de nitrógeno y/o alta irradiancia que han sido ampliamente descritas como generadoras de quistes (Boussiba et al. 1999; Grünewald et al. 2000; Orosa et al. 2005; Zhekisheva et al. 2002). En estas condiciones, se producen importantes cambios en la microalga tanto estructurales como metabólicos que impiden determinar cuáles son los que están directamente relacionados con la biosíntesis de astaxantina.

En este trabajo se han abordado estudios metabólicos pero utilizando cultivos continuos que permiten someter a las células a una limitación moderada de nitrógeno, mediante el balance adecuado entre velocidad de adición de medio y concentración de nitrato en este medio de aporte. De esta forma, se pueden obtener células palmeloides donde se está iniciando la biosíntesis de astaxantina y sin cambios drásticos en la morfología celular y en otros procesos metabólicos (sin la formación de quistes), disponiendo así de un modelo experimental idóneo para analizar los cambios en metabolitos que se producen en los estadios iniciales de la acumulación de astaxantina.

Atendiendo a esta premisa, la primera parte de este trabajo ha consistido en definir la adecuada combinación de velocidad de dilución y contenido en nitrógeno en el medio de aporte que generen células palmeloides con ligera acumulación de astaxantina.

El estudio conjunto de ambos factores refleja que la acumulación de astaxantina se empieza a registrar para concentraciones de nitrato iguales o inferiores a 3 mM, a todas las velocidades de dilución ensayadas pero especialmente a las más bajas, lo que implica un contenido de nitrógeno en la biomasa inferior al 5 %. El valor máximo de acumulación de pigmento (0,7 %) se obtiene para una concentración de nitrato de 1 mM y una velocidad de dilución de 0,3 d⁻¹. Este valor es superior al referenciado por García Malea (2006) (0,51 %), e inferior al obtenido por Del Río (2007) (1,1 %), pero en este último trabajo, los cultivos estaban sometidos a luz continua, no a ciclo solar.

La disponibilidad real de nitrato no depende únicamente de su concentración en el medio de aporte y de la velocidad a la que se suministra, sino también de la biomasa del cultivo. Estas tres variables se resumen en el concepto “suministro específico de nitrato, SEN” (Del Río et al. 2005). Cualquier modificación en alguna de estas variables tendrá influencia sobre el suministro específico de nitrato y por tanto en la acumulación de astaxantina. En las condiciones de este estudio, valores de SEN inferiores a 2 mmoles NO_3^- por gramo de biomasa y día inducen la acumulación de astaxantina, de forma similar a lo descrito por Del Río (2007) y García Malea (2006) (por debajo de 2,7 y 3 mmoles $\text{NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ respectivamente) alcanzándose valores máximos de acumulación de astaxantina (0,7 %) para SEN de 0,78 mmoles $\text{NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$. En definitiva, es necesario operar a un valor de velocidad de dilución relativamente elevado (0,7-0,9 d^{-1}) a la vez que a una concentración de nitrato en el medio de aporte inferior a 3 mM para que se den las condiciones de SEN y % de nitrógeno en la biomasa que induzcan una ligera acumulación de astaxantina en células donde la síntesis de astaxantina se esté iniciando.

Haematococcus pluvialis cambia su morfología a lo largo del ciclo de vida (Gu et al. 2013b) y se ha descrito que la acumulación de astaxantina está ligada a estos cambios morfológicos (Boussiba 2000; Castro et al. 2016). Los distintos tipos celulares van desde células pequeñas flageladas, que en general no acumulan pigmento, a células palmeloides que han perdido los flagelos pero mantienen la capacidad de dividirse y que puede acumular o no el pigmento, hasta quistes grandes esféricos que no se dividen y con alto contenido en astaxantina.

Los estudios de microscopía presentados, indican que los cultivos en suficiencia de nitrato (15 y 5 mM) están formados por células verdes, tanto flageladas como palmeloides. Las primeras prevalecen a velocidades de dilución altas (0,9 y 0,8 d^{-1}), mientras que las segundas van apareciendo a medida que disminuye la velocidad de dilución (0,7, 0,5 y 0,3 d^{-1}). Para la concentración de nitrato en el medio de 3 mM, se observa una mezcla de células flageladas y palmeloides tanto verdes como rojizas, siendo estas últimas mayoritarias a medida que disminuye la velocidad de dilución. Para las concentraciones de 2 y 1 mM, el cultivo está compuesto por palmeloides



rojizas y algunos quistes. Concretamente, la aparición de quistes se observa a velocidades de dilución bajas ($0,5$ y $0,3 \text{ d}^{-1}$) para concentraciones de nitrato de 3 y 2 mM , y a 1 mM , a todas las velocidades de dilución ensayadas. Estas observaciones morfológicas coinciden con las de García-Malea (2006) quien describe que para velocidad de dilución de $0,9 \text{ d}^{-1}$ y concentración de nitrato en el medio inferior a $2,5 \text{ mM}$, el cultivo está compuesto por células palmeloides rojizas.

Considerando en conjunto los valores de contenido en astaxantina y las observaciones microscópicas, se puede concluir que **la concentración de nitrato en el medio de aporte de 2 mM y velocidades de dilución de $0,7$ y $0,8 \text{ d}^{-1}$ generan cultivos compuestos por células palmeloides con acumulación de astaxantina.**

Aunque los valores constantes en el tiempo de concentración de biomasa indican que estos cultivos han alcanzado el estado estacionario, su color cambia (desde verde-marrón hasta marrón-rojizo) durante el tiempo de operación. La observación al microscopio revela que estos cambios están relacionados con la modificación del tamaño de las células palmeloides rojizas, lo que hace necesario refinar más las condiciones de cultivo para conseguir la homogeneidad en el tiempo de estos cultivos.

La luz afecta a procesos tan importantes como la diferenciación celular y la carotenogénesis (Imamoglu 2007; Mauricio y Landínez 2013; Kobayashi et al. 1997). También se le ha atribuido un papel sincronizador de los cultivos, cuando se someten a ciclos de luz-oscuridad (Mocquet et al. 2010; Poliner et al. 2015). Esto justifica los ensayos a distintas irradiancias y regímenes de iluminación buscando esta homogeneidad. En este sentido, condiciones de ciclos luz-oscuridad (12:12) con una irradiancia constante en el periodo de iluminación de $1300 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (valor medio de la irradiancia recibida bajo condiciones de ciclo solar con irradiancia máxima de $2500 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$), no mejoran la homogeneidad del cultivo, observándose una mezcla de flageladas rojizas, palmeloides rojizas de distintos tamaños, bolsas de división celular y, en baja proporción quistes, descartándose por tanto este régimen de iluminación. Sin embargo, cuando se someten los cultivos a un ciclo solar simulado, con menor irradiancia máxima que la utilizada inicialmente ($2000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y velocidad de dilución

de $0,8 \text{ d}^{-1}$ se consigue mantener una población homogénea de células palmeloides de tamaño similar que acumulan astaxantina (0,21%) y se mantienen estables en el tiempo. Según estos resultados, **se establecen las condiciones de $0,8 \text{ d}^{-1}$, 2 mM NO_3^- en el medio de aporte y un régimen de iluminación de ciclo solar simulado, con irradiancia máxima de $2000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, como las condiciones de cultivo idóneas para generar cultivos compuestos por células palmeloides rojizas con ligera acumulación de astaxantina.**

Para profundizar en el conocimiento de lo que ocurre con los morfotipos a lo largo del ciclo diario, se realiza un estudio en detalle de los cambios morfológicos y contenido de astaxantina de dichos cultivos, tanto en el periodo de luz como de oscuridad. Los cultivos sin limitación de nitrógeno mantienen el color verde a lo largo del día y durante varios días consecutivos, sin acumulación de astaxantina. Los morfotipos evolucionan desde bolsas conteniendo 4 células que se van formando durante la fase de oscuridad, pequeñas células flageladas que se liberan de las bolsas al comienzo de la etapa de iluminación y palmeloides verdes que aparecen al final de esta fase iluminada. Respecto a los cultivos en limitación de nitrógeno, durante el periodo de oscuridad, de forma similar a los cultivos en suficiencia, se forman sacos de gran tamaño, conteniendo hasta 32 células al final de esta fase. Al comenzar la iluminación, las células flageladas se liberan de los sacos y pierden rápidamente los flagelos y la envuelta celular, evolucionando hacia palmeloides que van aumentando su tamaño a medida que acumulan astaxantina, siempre sin formar quistes (Figura 41). Al llegar de nuevo la oscuridad, estas células palmeloides que ya tienen un cierto contenido en pigmento, si no han alcanzado un tamaño crítico, permanecen igual y no se dividen. Si supera ese tamaño umbral, comienzan a dividirse, formando sacos, que al llegar la fase de iluminación del día siguiente, repiten el ciclo. Las células palmeloides que no se han dividido en oscuridad, cuando se inicia el nuevo periodo de iluminación, continúan su crecimiento e incrementan el contenido de astaxantina, repitiéndose esta situación hasta alcanzar el tamaño adecuado para dividirse durante la oscuridad. Este comportamiento podría explicar que los cultivos en limitación presenten cambios en la coloración a lo largo del día y en días consecutivos.

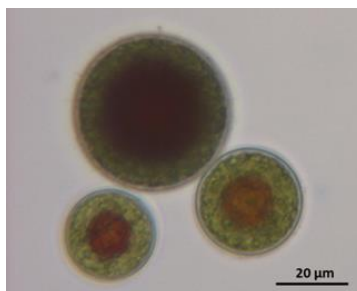


Figura 41: Diferencia de tamaño de células de *Haematococcus pluvialis* de cultivos continuos en estado estacionario. Condiciones experimentales: velocidad de dilución $0,8 \text{ d}^{-1}$, 2 mM NO_3^- en el medio de aporte, temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 7, ciclo solar simulado $I_{0 \text{ MAX}} 2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y caudal de aire $16,7 \text{ l aire (l cultivo)}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

De este análisis se desprende que bajo las condiciones de cultivo impuestas en este estudio, la división celular sólo tiene lugar durante la fase de oscuridad. Este comportamiento ya ha sido descrito para *Haematococcus pluvialis* cuando crece bajo la influencia de ciclos de luz-oscuridad (12:12) (Rioboo et al. 2011) y para otras microalgas, como *Chlamydomonas reinhardtii*, donde la división nuclear y la citocinesis ocurren en la fase de oscuridad, produciéndose la liberación de las células hijas en la transición de oscuridad a luz (Matsuo e Ishiura 2010). *Nannochloropsis oceánica* CCMP1779, durante el periodo de iluminación, aumenta de tamaño hasta alcanzar un nivel crítico que, con la llegada de un ciclo de oscuridad, entra en división (Poliner et al. 2015).

La sustitución de células flageladas por palmeloides rojizas a medida que aumenta la irradiancia incidente ha sido explicada por Han et al. (2012), como una respuesta a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en condiciones de iluminación, que podrían causar daños en los componentes fotosintéticos y en la membrana. Para evitar esto, las células acumulan astaxantina como antioxidante, generando el morfotipo palmeloide.

Por tanto, *Haematococcus pluvialis* tiene un comportamiento complejo respecto a la luz. En las condiciones en las que se ha desarrollado este estudio, existe una respuesta diferente de los dos tipos celulares, de manera que, las células rojizas son mucho más sensibles a la irradiancia que las verdes, ya que una vez se ha

desencadenado la síntesis de astaxantina en condiciones de limitación de nitrógeno, la luz actúa potenciando la acumulación del pigmento (Del Río et al. 2005), lo que a su vez repercute en un incremento del tamaño celular. Está descrito que la luz también afecta al momento en el que tiene lugar la división, marcando una separación temporal entre el crecimiento del volumen celular durante el periodo de iluminación y la división de las células durante la oscuridad (Rioboo et al. 2011). Sin embargo, en otros estudios desarrollados bajo luz continua, la célula es capaz de dividirse durante el periodo de iluminación (Del Río 2007), lo que sugeriría que la microalga adapta su comportamiento según las condiciones de cultivo impuestas.

Disponer de cultivos estables de células palmeloides rojizas con ligera acumulación de astaxantina ha permitido analizar los distintos metabolitos presentes en estas células y relacionarlos con los de células verdes sin acumulación del pigmento. Se han determinado y comparado los contenidos en carotenoides, ácidos grasos, aminoácidos libres, ácidos orgánicos y azúcares.

En las células rojizas **el contenido en astaxantina se multiplica por 15**, aumenta el contenido en cantaxantina (que se multiplica por 9) y disminuye β caroteno, luteína y violaxantina, en comparación con los niveles registrados en células verdes. El menor contenido en luteína en células palmeloides se podría explicar por el flujo preferencial hacia la formación de δ -caroteno (Jin et al. 2017). El β -caroteno también disminuye en las células palmeloides al ser utilizado como sustrato para la síntesis inicial de astaxantina. Está descrito que la síntesis de β -caroteno no está favorecida en condiciones de acumulación de astaxantina (Lemoine and Schoefs 2010). Del mismo modo, el menor contenido en violaxantina en células palmeloides rojizas respecto a las células verdes, se explicaría por la desviación de la ruta hacia la síntesis de cantaxantina y astaxantina, que incrementan sus niveles en estas células rojizas.

En la ruta de biosíntesis de carotenoides (Figura 42) hay un punto de ramificación que da lugar por una parte a α -caroteno (precursor de luteína) y por otra a β -caroteno (precursor de carotenoides secundarios) (Grünewald et al. 2000; Shah et al. 2016). La síntesis inicial de astaxantina utiliza como precursor el β -caroteno



existente, mientras que a medida que se acumula astaxantina, se requiere la síntesis de β -caroteno de novo (Schoefs et al. 2001). En células verdes en fase vegetativa, la *β -caroteno hidrolasa* es la enzima preferencialmente expresada produciendo zeaxantina y a partir de ella violaxantina. Sin embargo, bajo condiciones de limitación de nutrientes se favorece la sobreexpresión de la *β -caroteno cetolasa (BKT)* y por tanto la síntesis de cantaxantina y a partir de ella, por la *hidroxilasa*, la de astaxantina (Vidhyavathi et al. 2008).

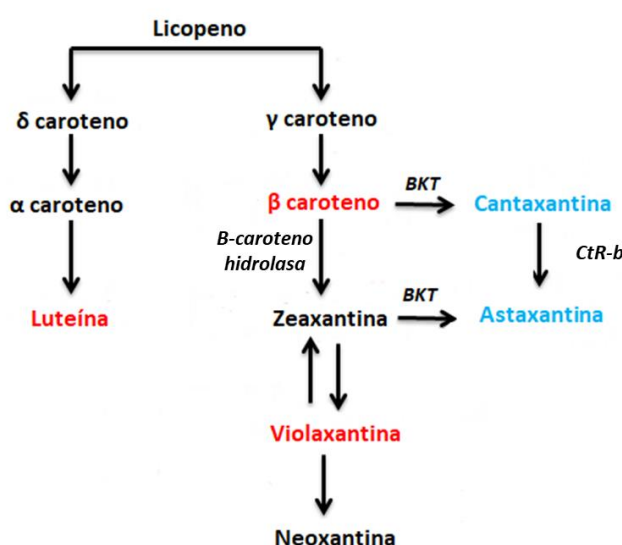


Figura 42: Ruta de síntesis de carotenoides a partir del licopeno en *Haematococcus pluvialis* (modificada de Shah et al. 2016). Se destaca en rojo los carotenoides que **disminuyen** sus niveles intracelulares y en azul los que **aumentan** en las células palmeloides rojizas en comparación con las células verdes. Los compuestos que no se destacan no se detectaron. BKT: *β -caroteno cetolasa*; CtR-b: *β -caroteno hidroxilasa*.

Los ensayos in vitro de *cetolasa (BKT)* e *hidroxilasa (CtR-b)* indican que la síntesis de astaxantina en *Haematococcus* está preferentemente precedida por la adición de grupos *ceto*, seguida por la hidroxilación (Schoefs et al. 2001) y confirman que la astaxantina de *Haematococcus* procede de cantaxantina (Lee et al. 2008) en oposición al trabajo de Steinbrenner y Linden (2001) que afirman que el orden de actuación de *cetolasa* e *hidroxilasa* es intercambiable y por tanto se puede obtener astaxantina tanto a partir de cantaxantina como de zeaxantina.

No todas las microalgas comparten esta secuencia de reacciones para sintetizar astaxantina. En el caso de *Chlorella zofingiensis*, deriva de la zeaxantina y su acumulación es muy rápida, detectándose a las cuatro horas de la privación de nitrógeno (Han et al. 2013). Está descrito en *Haematococcus pluvialis* que en condiciones de estrés, los tres genes que codifican para *BKT* están sobreexpresados y cuando los niveles de mensajero alcanzan un determinado umbral comienza la síntesis de astaxantina (Huang et al. 2006).

En algunas microalgas, como *Nannochloropsis sp.*, bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno, tiene lugar una elevada biosíntesis de ácidos grasos y un aumento en el contenido de triacilglicerol, ya que sirven como sumidero del exceso de carbono fijado en la fotosíntesis y del NADPH generado (Shtaida et al. 2015). Sin embargo, *Haematococcus pluvialis* primero acumula almidón como sustancia de reserva y a partir de él sintetiza ácidos grasos como respuesta a largo plazo (Recht et al. 2012; 2014). Esto se corresponde con los resultados de microscopía electrónica obtenidos en este trabajo donde las células palmeloides rojizas en la etapa inicial de acumulación de astaxantina, presentan grandes gránulos de almidón.

En células de *Haematococcus pluvialis* crecidas en suficiencia de nitrógeno, el contenido de ácidos grasos en la biomasa se sitúa en torno al 5 %, inferior al descrito para otras microalgas (Del Río et al. 2015). **En células rojizas este contenido aumenta un 33 %, alcanzando el 6,5 % en la biomasa, probablemente para cubrir la demanda de ácidos grasos para la esterificación de las moléculas de astaxantina que se están sintetizando en esas condiciones.** En *Haematococcus pluvialis* alrededor del 90 % de las moléculas de astaxantina están esterificadas con ácidos grasos (Yuan et al. 1997). El ácido oleico es el ácido graso más común en estos conjugados (Holtin et al. 2009; Recht et al. 2014; Yu et al. 2015; Zhekisheva et al. 2002), además de palmítico, esteárico, linoleico, linolénico y araquidónico que también están implicados en la formación de ésteres de astaxantina (Weesepeel et al. 2013). Existe una correlación lineal entre el contenido celular de ácidos grasos y el contenido en astaxantina bajo condiciones de estrés (Chen et al. 2007; Zhekisheva et al. 2002) lo que sugiere que la biosíntesis de astaxantina y de ácidos grasos están acopladas en esta microalga (Chen



et al. 2015). El punto de conexión de ambas rutas podría ser el Acetil-CoA. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que la adición de cerulenina (inhibidor de la síntesis de ácidos grasos) o de norfluorazón (inhibidor de la biosíntesis de carotenoides) bloquean ambas rutas (Chen et al. 2007; Schoefs et al. 2001). Así, la inhibición de la síntesis de astaxantina por norfluorazón aumentaría los niveles de Acetil CoA disponibles, que a su vez inhibiría la síntesis de ácidos grasos por un mecanismo de inhibición *feedback* al actuar sobre la *Acetil CoA carboxilasa*, enzima limitante en la biosíntesis de ácidos grasos (Ohlrogge y Jaworski 1997). Igualmente, las enzimas responsables de la síntesis de astaxantina estarían bajo regulación *feedback* cuando la biosíntesis de ácidos grasos se inhibiese por cerulenina (Han et al. 2013). Los resultados obtenidos en este trabajo, de un aumento del 33 % en ácidos grasos en las células rojizas respecto a las verdes, se ajustan a esta hipótesis. Sin embargo, otros autores mantienen que la acumulación de ácidos grasos es independiente de la síntesis de astaxantina (Lv et al. 2016).

Los demás ácidos grasos apenas sufren modificación en esta etapa inicial de biosíntesis de astaxantina por limitación moderada de nitrógeno. Sin embargo, Recht et al. (2014) refieren una subida general en todos los ácidos grasos pero bajo condiciones severas de estrés por hambre de nitrógeno, cuando las células ya han derivado a quistes.

Aunque el perfil de aminoácidos libres varía entre especies de microalgas, de forma general, arginina y glutámico son mayoritarios, atribuyéndose su relevancia al papel como reservorio de nitrógeno, precursor de la síntesis de otros aminoácidos por transaminación, (Willamme et al. 2015) y su relación con el ciclo del ácido cítrico (Betancort et al. 1997). En especies de microalgas usadas comúnmente en acuicultura (*Tretraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Thalassiosira sp.*, *Skeletonema costatum* y *Chaetoceros calcitrans*) aspártico, glutámico y arginina suponen más del 60 % del total de aminoácidos libres (Derrien et al. 1998). Está descrito que en células de *Haematococcus pluvialis* (Shah et al. 2016) y en otras especies del género *Haematococcus* (Kim et al. 2015) con alto contenido en astaxantina, aspártico, glutámico, alanina y leucina son los más abundantes. En **las dos situaciones**

metabólicas estudiadas en este trabajo, los aminoácidos mayoritarios son glutámico, aspártico y alanina, aunque con diferencias entre células que acumulan astaxantina y las que no lo hacen, **ya que en células rojizas hay un 34 % menos de glutámico y un 66 % y 52 % menos de aspártico y alanina respectivamente**. En condiciones de limitación de nutrientes, los aminoácidos pueden utilizarse como fuente de energía ingresando alguno de ellos en el ciclo del ácido cítrico (TCA) a través de las reacciones anapleróticas (Nelson y Cox 2008). Esto podría justificar la disminución del contenido en aminoácidos libres en células rojizas respecto de las verdes. Otra posible explicación a este descenso sería su desaminación y acumulación en forma de GABA, descrita para cultivo de *Haematococcus pluvialis* en ausencia de nitrógeno y alta luz (Recht et al. 2014). En un trabajo reciente (Vendruscolo et al. 2018), se ha demostrado que la alanina es uno de los aminoácidos más abundantes en condiciones de crecimiento estándar en *Haematococcus pluvialis* y otras microalgas como *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*, confirmando los resultados obtenidos en este trabajo, donde la alanina es el segundo aminoácido más abundante tanto en células verdes como rojizas.

La señal para treonina puede considerarse un artefacto ya que aparece asociada a una señal no aminoacídica debida al proceso de derivatización (Derrien et al. 1998). De forma similar, la señal para histidina está solapada con la de GABA, por lo que no es posible discriminar si el aumento de este pico en situaciones de acumulación de astaxantina se debe a un mayor contenido en histidina o una subida en GABA que está favorecida en condiciones de estrés (Bouché y Fromm 2004; Recht et al. 2014).

El ciclo del ácido cítrico (TCA) es la vía central del metabolismo celular. Es la puerta de entrada al metabolismo aeróbico de la mayoría de las biomoléculas para generar energía, así como fuente importante de precursores para la biosíntesis de macromoléculas. Se ha descrito que su actividad cambia en respuesta a las señales ambientales, tanto en plantas (Sweetlove et al. 2010), como en animales (Atherton et al. 2006). Un comportamiento similar se ha descrito en microalgas, con un incremento de la actividad del ciclo en respuesta a alta irradiancia y restricción de nutrientes (Kim et al. 2011).



Estudios previos en *Haematococcus pluvialis* y otras microalgas (Lee et al. 2012; Recht et al. 2014; Wienkoop et al. 2010; Xiong et al. 2010) han evidenciado dificultades para la identificación de ácidos orgánicos, derivadas de las bajas concentraciones en las que éstos se encontraban en las células de microalgas y/o los límites de detección de las técnicas utilizadas. Por ejemplo, algunos intermediarios del ciclo de TCA, como oxaloacetato y α -cetoglutarato, no pueden ser detectados en cultivos en hambre de nitrógeno de *Haematococcus pluvialis* (Recht et al. 2014). Estos problemas metodológicos también están descritos por Wang et al. (2008) para ácidos orgánicos con diferente grado de volatilidad (lo que afecta a su concentración) en plantas de tabaco.

Para abordar el estudio de los intermediarios del ciclo TCA y realizar su cuantificación, en este trabajo se ha optimizado la metodología GC-MS descrita en la bibliografía, que también ha permitido a la determinación de azúcares. En un primer análisis del perfil metabólico de *Haematococcus pluvialis* en condiciones de suficiencia y limitación de nitrógeno, no se registra señal para fumarato y α -cetoglutarato, bien por baja concentración en la muestra y/o por encontrarse por debajo del límite de detección del método. En concreto, se han revisado los procedimientos de muestreo (con parada del metabolismo) y extracción de metabolitos, se ha analizado la interferencia de la matriz celular en la derivatización, se han normalizado los datos mediante un patrón interno, mejorando con ello la detección de todos los metabolitos de forma simultánea.

La toma de muestras se ha realizado mediante la técnica de “quenching”, y debe ser lo más rápida posible para “detener” el metabolismo en el momento deseado, proporcionando una “instantánea” de la situación metabólica de la célula. De los distintos métodos ensayados (Bölling y Fiehn 2005; Veyel et al. 2014), la centrifugación en frío y posterior liofilización es el más idóneo para *Haematococcus pluvialis*. Respecto a la derivatización (Kombu, et al. 2011; Orata 2012; Roessner 2001; Ruiz-Matute et al. 2011;), se ha seleccionado el método en dos etapas (Roessner 2001), una de oximación y otra de sililación seguida de GC-MS en modo SCAN de adquisición de datos. Por otra parte, se ha verificado mediante la adición de un patrón

externo, que la recuperación del método es del 100 %, sin interferencia de la matriz celular durante la derivatización (Fernandez Segovia y Martínez García 2005).

El protocolo optimizado permite detectar todas las sales de ácidos orgánicos presentes en la muestra con la excepción de oxaloacetato y piruvato, que comparten tiempo de retención y tienen patrones de fragmentación idénticos, detectándose como un único compuesto. Cambios en la temperatura del inyector o en la rampa de temperatura no mejoran la separación. El análisis mediante HPLC corrobora la descomposición espontánea del ácido oxaloacético en ácido pirúvico detectando dos picos distintos con patrones de ácido oxaloacético.

La detección de un compuesto depende de la cantidad presente en la muestra biológica (influenciada por las condiciones de cultivo) y de la intensidad de la señal, que está relacionada a su vez, con su patrón de fragmentación. Así, por ejemplo, es posible la detección de α -cetoglutarato en muestras de *Chlamydomonas* (Veyel et al. 2014), mientras que en *Haematococcus pluvialis*, a veces sí se detecta (Su et al. 2014) y otras no (Recht et al. 2014). Los problemas de detección encontrados en este trabajo para α -cetoglutarato podrían estar relacionados con su baja concentración, menor a la del resto de los ácidos orgánicos, y a la baja señal que ofrece el detector cuando se opera en condiciones estándar (*full scan*, Split 1:20), que sólo permite detectar patrones de este compuesto cuando su concentración es superior a 200 μ M. De forma similar, el fumarato no se puede detectar utilizando el modo estándar y los patrones sólo son visibles a partir de 100 μ M.

Cuando un metabolito particular está presente a niveles muy bajos en la muestra y/o tiene un límite de detección alto, el modo de adquisición de exploración completa *full scan* aplicado comúnmente, no alcanza la resolución requerida, por lo que es necesario aplicar una metodología más sensible, el modo *selected ion monitoring* o modo SIM. Operar en modo SIM permite aumentar la relación señal/ruido y mejorar la detección de los compuestos enmascarados en la línea base del cromatograma, como el α -cetoglutarato y fumarato.



Mediante una combinación de modos de adquisición, exploración completa (*full scan*) y monitoreo selectivo de iones (SIM), se han podido cuantificar los niveles de succinato, fumarato, malato, α -cetoglutarato y citrato en los extractos de *Haematococcus pluvialis* independientemente de su concentración.

De forma general, los intermediarios del TCA, además de la producción de energía, participan directa o indirectamente en rutas importantes para la formación de compuestos como lípidos, proteínas y pigmentos (Vendruscolo et al. 2018). Recht et al. (2014) han relacionado la carotenogénesis con el aumento de la actividad del TCA en cultivos de *Haematococcus pluvialis*. La acumulación de astaxantina en esta microalga también se ha asociado a un aumento de la expresión de genes relacionados con glucólisis, TCA y fosforilación oxidativa (Kim et al. 2011). Su et al. (2014) han identificado cambios en diversos metabolitos (D-ribosa 5 fosfato, glutamato y α -cetoglutarato) acoplados a la acumulación de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* en respuesta a estrés por alta luz, ion ferroso o acetato.

Tanto en células verdes como en células rojizas, los ácidos orgánicos más abundantes son succinato, malato y citrato, de forma similar a lo descrito para *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* (Vendruscolo et al. 2018). **Los cultivos que están sintetizando astaxantina tienen menor contenido de malato, fumarato, succinato, piruvato, oxaloacetato y α -cetoglutarato y un 25 % más de citrato que los cultivos sin astaxantina.** Este comportamiento es similar al publicado para *Chlamydomonas reinhardtii* en condiciones de hambre de nitrógeno (Bölling and Fiehn 2005) o para *Arabidopsis* como respuesta a la limitación de nitrato (Tschoep et al. 2009). Sin embargo, otros estudios en régimen estanco con *Chlamydomonas reinhardtii* en hambre de nitrógeno y luz continua, evidencian un incremento de los niveles de citrato, oxoglutarato, succinato y malato (Wase et al. 2014), o un aumento de los niveles de malato y succinato (Wienkoop et al. 2010). Por otro lado, en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 se ha descrito una subida sustancial de los niveles de succinato, malato y fumarato sin cambios en los de citrato, en respuesta a la privación de nitrógeno (Osanai et al. 2014).

Recht y colaboradores (2014) en su estudio con cultivos de *Haematococcus pluvialis* sometidos a hambre de nitrógeno durante 48 horas, muestran un aumento gradual del contenido de piruvato, malato, fumarato y succinato a lo largo del tiempo de experimentación y una disminución de citrato, que se corresponde con un incremento de la actividad de las enzimas involucradas en estas reacciones, la *fosfoenolpiruvato carboxilasa*, *enzima málica*, *malato deshidrogenasa*, *citrato sintasa* y *aconitasa*. Los patrones de cambio tanto en la actividad enzimática como en la abundancia de metabolitos indican una mejora general del ciclo de TCA y de los procesos metabólicos estrechamente asociados con éste. La discrepancia con los resultados presentados en este trabajo puede estar relacionada con la diferente situación experimental: el trabajo de Recht et al. (2014) está realizado con cultivos en estanco y ausencia total de nitrógeno, comparando células vegetativas con quistes.

El α -cetoglutarato es un metabolito clave implicado en la asimilación primaria de amonio que conecta el metabolismo del carbono y del nitrógeno. En este estudio se detecta una bajada sustancial de su contenido (del 62 %) en las células rojizas respecto a las verdes, relacionado con la bajada previamente comentada de glutámico en las células rojizas, ya que α -cetoglutarato es el sustrato para la formación de ácido glutámico, necesario para la síntesis del resto de aminoácidos y por tanto, de proteínas. El α -cetoglutarato es el metabolito directamente afectado por la limitación nitrogenada. En este estudio no se ha observado su acumulación en condiciones de acumulación de astaxantina sino de un metabolito anterior en la ruta, el citrato, posiblemente debido a una actuación de las enzimas *isocitrato deshidrogenasa* y *aconitasa* en sentido inverso. Sin embargo, en estudios preliminares desarrollados en nuestro grupo utilizando cultivo continuo, con limitación moderada de nitrógeno y luz continua (Del Río 2007) se observó un incremento de los niveles intracelulares de α -cetoglutarato. Este resultado coincide con el de Su et al (2014), utilizando sales de hierro, acetato o una combinación de ambos bajo luz continua como factor de estrés para desencadenar la síntesis de astaxantina.

La señal registrada como sumatorio de piruvato y oxaloacetato es menor en células rojizas que en la verdes posiblemente por su utilización en condiciones de

síntesis de astaxantina. Ambos compuestos son intermediarios en múltiples rutas metabólicas: TCA, gluconeogénesis, síntesis de aminoácidos y ácidos grasos o ciclo de la urea para el caso del oxaloacetato y TCA, síntesis de aminoácidos y ácidos grasos para el piruvato (Nelson y Cox 2008). Este piruvato está descrito como precursor del IPP en *Chorella zofingiensis* y en *Haematococcus pluvialis* (Grünwald et al. 2001) y de la síntesis de ácidos grasos necesarios para la esterificación de la astaxantina (Recht et al. 2014).

En situación de acumulación de astaxantina el malato experimenta una bajada del 50 %, que podría explicarse por la mayor actividad del TCA o por su descarboxilación oxidativa a piruvato mediante la *enzima málica* (Xue et al. 2016). Se ha sugerido que el malato desempeña un papel clave, pero de forma indirecta, en la biosíntesis de ácidos grasos bajo condiciones de estrés que favorecen la carotenogénesis (Recht et al. 2014), proponiendo un flujo significativo de malato desde la mitocondria al cloroplasto, donde se convierte en piruvato (Figura 43). Esta hipótesis se ha confirmado utilizando sésamol, un inhibidor de la *enzima málica*. Tras 24 horas de exposición a este compuesto, la síntesis de los ácidos grasos principales en *Haematococcus pluvialis* se ve inhibida, sugiriendo que la mayoría de los ácidos grasos proceden de esa vía (Recht et al. 2012). Además, en la descarboxilación del malato se genera NADPH necesario para la síntesis y desaturación de los ácidos grasos (Kendrick y Ratledge 1992).

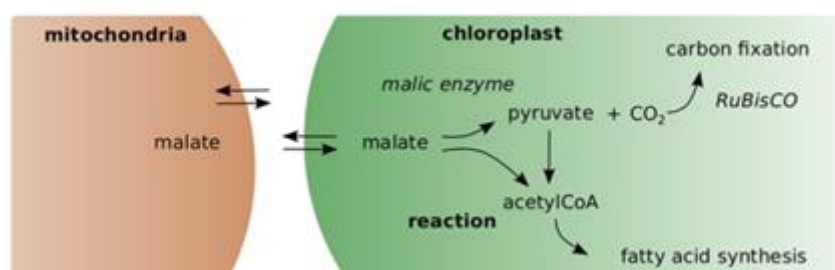


Figura 43: Mecanismo propuesto de la redistribución del carbono del TCA en la biosíntesis de ácidos grasos mediante la migración del malato desde la mitocondria al cloroplasto. (Fuente: modificada de Recht et al. 2014).

El Acetil CoA se une a oxalacetato para generar citrato en el primer paso del ciclo TCA. El citrato no utilizado en el TCA, se puede exportar al citoplasma (Figura 44). De esa forma se evita la acumulación de Acetil CoA en la mitocondria, donde podría actuar como inhibidor del TCA y de la biosíntesis de ácidos grasos (regulador negativo de la *Acetil CoA carboxilasa*). El citrato transportado al cloroplasto puede descomponerse en Acetil CoA y oxalacetato mediante la *citrato liasa*. Este Acetil CoA participaría en la síntesis de Malonil CoA (precursor de los ácidos grasos) que actuaría como modulador positivo de esta ruta. A su vez, el oxaloacetato, por acción de la *malato deshidrogenasa* formaría malato, que por la *enzima málica* sintetizaría piruvato. Además, el citrato citoplasmático activa la *Acetil CoA carboxilasa* que cataliza la reacción de síntesis de ácidos grasos a partir de Acetil CoA (Nelson y Cox 2008).

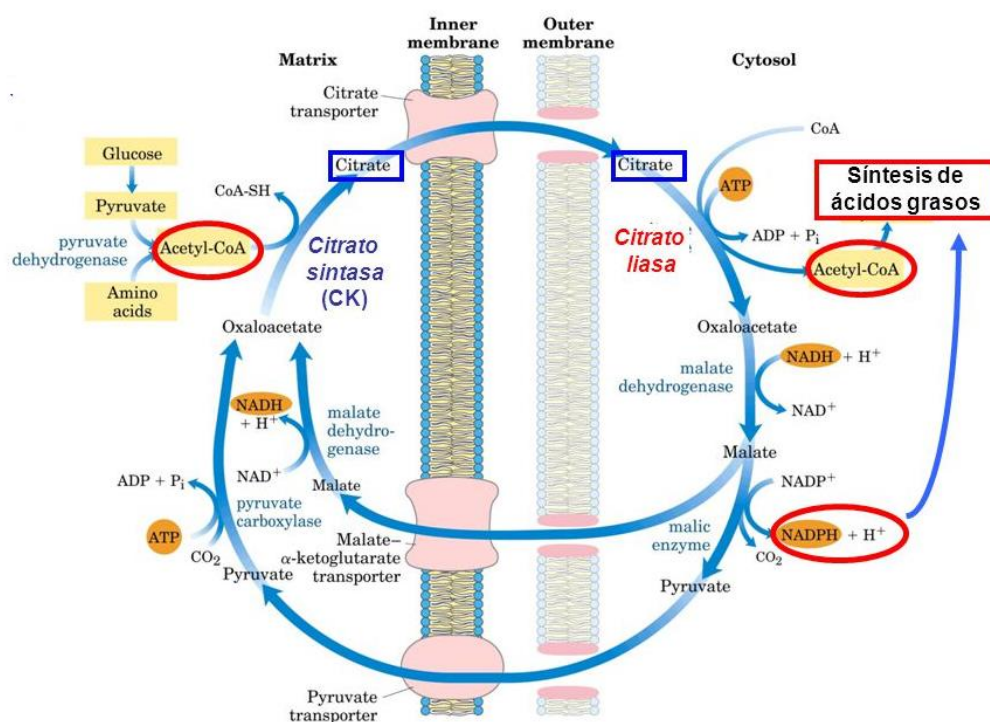


Figura 44: Lanzadera de grupos acetilo en forma de citrato desde la mitocondria al citosol (Fuente: Nelson and Cox 2008).

El citrato también se ha relacionado con activación de la ruta de síntesis de astaxantina. En *Chlorella zofingiensis* se ha demostrado que actúa como molécula



señal promoviendo la expresión de *BKT* (β -caroteno transcetolasa), implicada directamente en la síntesis de astaxantina (Li et al. 2008).

Por otra parte, se ha observado en algunas microalgas, un incremento de los niveles de citrato en condiciones de hambre de nitrógeno, concretamente en diatomeas (Bromke et al. 2015) y en *Chlamydomonas reinhardtii* (Shtaida et al. 2015; Wase et al. 2014). La eliminación del nitrógeno del medio de cultivo repercute en un incremento de la síntesis de dos de las subunidades que componen el complejo enzimático de la *piruvato deshidrogenasa*, por lo que en estas condiciones nutricionales la conversión de piruvato hacia Acetil-CoA estaría favorecida.

Los datos mostrados del estudio metabólico y enzimático en *Chlamydomonas reinhardtii* en hambre de nitrógeno indican que los niveles de citrato aumentan coordinadamente con un aumento de la expresión de las enzimas *piruvato carboxilasa*, *citrato sintasa* y *ATP citrato liasa*. A su vez, también se correlaciona con el aumento de lípidos durante transcurridas 144 h en ausencia de nitrógeno (Wase et al. 2014).

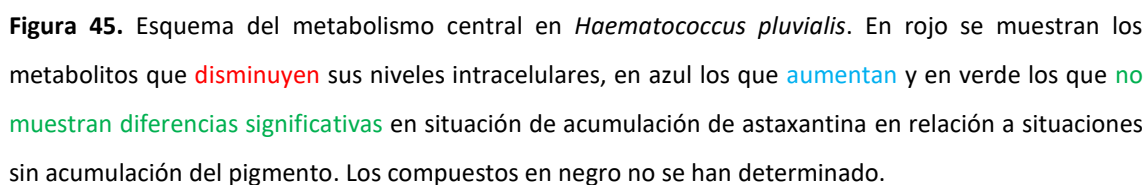
Los resultados obtenidos en este trabajo sitúan al citrato como molécula relacionada con la activación de la ruta síntesis de astaxantina y ácidos grasos, que explicaría el aumento de sus niveles celulares (del 25 %) en situaciones de síntesis de astaxantina.

Precisamente, estos ácidos orgánicos que están alterados en las células con acumulación de astaxantina (malato, citrato y piruvato), se han utilizado para el crecimiento heterotrófico de *Chorella zofingiensis*, observándose una producción incrementada de astaxantina (Chen et al. 2009). Además, se ha propuesto la adición de citrato (Lemoine y Schoefs 2010), y piruvato (Kobayashi et al. 1991) exógena al medio de cultivo de *Haematococcus pluvialis* para promover la acumulación de astaxantina. En este sentido se han realizado pruebas preliminares adicionando distintas concentraciones (5, 10, 50 y 100 mM) de citrato, α -cetoglutarato, piruvato y succinato sódico a cultivos de *Haematococcus pluvialis* en condiciones de suficiencia nitrogenada y observándose acumulación de astaxantina a las 48 horas a partir de la concentración

de 50 mM para el α -cetoglutarato sódico y el citrato sódico, y de 100 mM para el piruvato sódico y succinato sódico (datos no mostrados).

En las células que acumulan astaxantina, se observa un incremento del contenido de todos los azúcares estudiados respecto al de células verdes, con excepción de la trehalosa. Este aumento es especialmente significativo para glucosa, fructosa, y sacarosa. Resultados similares se han obtenido en cultivos de *Haematococcus pluvialis* sometidos a alta luz para inducir la síntesis de astaxantina (Lv et al. 2016) registrándose un aumento de los niveles de fructosa, galactosa, glucosa, sacarosa y trehalosa en células palmeloides rojizas relacionando el contenido de sacarosa con un efecto protector en la célula. Recht y colaboradores (2014) describen un incremento considerable de los niveles de sacarosa, fructosa, glucosa y maltosa en *Haematococcus pluvialis* en ausencia de nitrógeno. En otras microalgas como *Chlamydomonas reinhardtii*, la limitación de nitrógeno también aumenta los niveles de glucosa y fructosa ya que el flujo de carbono en la célula está siendo dirigido hacia la síntesis de almidón, en el que la trehalosa juega un papel importante como regulador positivo (Valledor et al. 2014; Wienkoop et al. 2010). En trabajos recientes con la microalga *Chlorella zofingiensis* (Huang et al. 2016; Zhang et al. 2019), describen a la glucosa como metabolito involucrado en la síntesis de astaxantina, promoviendo la expresión de genes de la ruta biosintética (*PSY*, *LCYb*, *CHYb* y *BKT*) y potenciando además la síntesis de ácidos grasos.

En la Figura 45 se recogen los cambios en metabolitos detectados en células con acumulación de astaxantina en respuesta a la limitación moderada de nitrógeno respecto a células sin acumulación.



Está descrito que diversos metabolitos responden a la luz, tanto en plantas como en microalgas (Serrano-Bueno et al. 2017). En este trabajo se ha analizado el perfil metabólico de cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis* durante el periodo de oscuridad para establecer posibles diferencias respecto a los determinados en luz. **El contenido en carotenoides, aminoácidos y ácidos grasos no cambia en la fase de oscuridad respecto al medido en luz. Sin embargo, el contenido en ácidos orgánicos y azúcares, se reduce durante este periodo, posiblemente al utilizarse como sustratos respiratorios.** *Haematococcus pluvialis* en oscuridad metaboliza sus compuestos de reserva como fuente de carbono (Zhang et al. 2016).

El TCA sigue un flujo cíclico cuando necesita generar ATP (Sweetlove et al. 2010) y no puede obtenerlo mediante otras vías como la fotosíntesis. Durante el periodo de iluminación, el TCA funcionaría anabólicamente, como fuente de precursores, desviando sus intermediarios hacia vías biosintéticas (Lv et al. 2016). Sin embargo, durante el periodo de oscuridad, el TCA seguiría el flujo cíclico para generar energía necesaria para crecer en estas condiciones y cada intermediario sería consumido rápidamente para la síntesis del siguiente, lo que podría explicar las bajas concentraciones detectadas y las diferencias respecto a lo observado en las muestras tomadas en luz.

En el periodo de oscuridad, en situación de acumulación de astaxantina, se produce una bajada de todos los carotenoides excepto de astaxantina y cantaxantina que experimentan una subida respecto a los cultivos verdes. El contenido en la biomasa de ácidos grasos aumenta ligeramente debido principalmente a la subida de ácido palmítico, esteárico y sobretodo de oleico. Los aminoácidos libres disminuyen en esta situación de acumulación y respecto a los ácidos orgánicos, el nivel de α -cetoglutarato y citrato es superior al medido en células verdes. En referencia a los azúcares, glucosa y fructosa disminuyen mientras que trehalosa y sacarosa aumentan.

Comparando las variaciones observadas entre células verdes y rojizas durante el periodo de iluminación con lo que ocurre en oscuridad, no se detectan cambios en el



comportamiento de carotenoides y aminoácidos libres. Respecto a los ácidos grasos, en situación de acumulación de astaxantina, tanto en luz como en oscuridad se produce incremento notable del ácido oleico. Además, el ácido linoleico también aumenta durante el periodo de iluminación y el ácido palmítico y esteárico en oscuridad. Respecto a los ácidos orgánicos, el citrato aumenta en luz y mucho más notablemente en oscuridad, lo que se podría explicar porque está descrito que el citrato actúa como señal bioquímica y de expresión génica de la respiración celular (Li et al. 2008). El nivel de α -cetoglutarato aumenta, aunque levemente, sólo en oscuridad. En la biomasa procedente de células palmeloides rojizas recogidas en luz, se registra un incremento en glucosa y fructosa y un descenso de trehalosa respecto a las células verdes. Sin embargo, en oscuridad, el comportamiento es opuesto con un acusado descenso de glucosa y fructosa en condiciones de acumulación de astaxantina, posiblemente porque se estén utilizando como sustratos respiratorios. El contenido en sacarosa aumenta tanto en luz como en oscuridad.

La actividad fotosintética en *Haematococcus pluvialis* varía de forma considerable en los distintos tipos celulares. Las células verdes tienen mayor actividad del fotosistema II, lo que significa una eficiencia mayor en la conversión de la energía absorbida por el PSII en energía química y una menor disipación de energía no fotoquímica en forma de calor, en comparación con las palmeloides rojizas, aunque éstas mantienen actividad fotosintética durante la acumulación de astaxantina. (Chen et al. 2012; Gu et al. 2013; 2014; Wang et al. 2014).

Las células rojizas muestran una tasa de transporte de electrones y un rendimiento del PS II un 33 % menor que las células verdes, con el consecuente incremento (del 73 %) de la disipación de energía en forma de calor. A pesar de esto, conservan su maquinaria activa, con una eficiencia fotosintética (F_v/F_m) de 0,67 frente al valor de 0,74 medido en células verdes. Wang et al. (2014) describen un comportamiento similar en células verdes y rojizas de *Haematococcus pluvialis*.

La microscopía electrónica permitió verificar que **los cultivos compuestos por células palmeloides rojizas, no presentan degradación o segmentación de las**

membranas tilacoidales, en consonancia con las medidas de actividad fotosintética. En *Haematococcus pluvialis*, el desensamblaje de la maquinaria fotosintética está asociada a la formación de quiste (Gu et al. 2013; Wayama et al. 2013), posiblemente como mecanismo de respuesta a este estrés nutricional. Al interrumpirse el flujo lineal de electrones de la cadena fotosintética, se promueve el flujo cíclico a nivel del PSI, produciendo las cantidades de ATP requeridas para la producción de astaxantina y ácidos grasos (Gu et al. 2013; Huang et al. 2019; Wang et al. 2014).

El estudio de la ultraestructura de células verdes y rojizas evidencia otras diferencias entre ambos tipos celulares, como **la acumulación de gránulos de almidón en células crecidas en limitación moderada de nitrógeno** apenas presentes en células verdes, referida por otros autores (Gu et al. 2013; Kim et al. 2015; Klochkova et al. 2013; Recht et al. 2014; Shah et al. 2016; Wayama et al. 2013). En quistes, la sustancia de reserva acumulada no es almidón sino ácidos grasos, con la aparición de un gran número de cuerpos lipídicos citosólicos donde se acumula la astaxantina (Santos y Mesquita 1984). **En las células palmeloides rojizas se incrementa el número de vesículas lipídicas y su tamaño respecto a las presentes en las células verdes.**

Haematococcus pluvialis presentan una matriz extracelular voluminosa, típica de la familia *Volvocaceae*, con una envuelta cristalina tripartita, entre dos capas separadas de matriz gelatinosa. La capa cristalina está conectada a la membrana citoplasmática. Durante la transformación a células palmeloides, se forma la primera pared celular dentro de la matriz extracelular, mientras que la formación de los quistes implica el desarrollo de una pared secundaria mucho más resistente (Hagen et al. 2001). **En las células palmeloides rojizas se observa un engrosamiento de la pared celular y formación de la pared celular primaria con la consecuente desaparición de la envuelta cristalina tripartita y la disminución de la matriz extracelular previo a la formación de la pared secundaria.**

La futura expansión de la producción de *Haematococcus pluvialis* como alternativa rentable para la producción de este pigmento de forma natural frente a la síntesis química y su aplicación en actividades económicas extensivas, solo será posible



con el incremento del rendimiento del proceso y el consiguiente abaratamiento del producto. Para que esto sea factible, es necesaria la optimización de las condiciones de cultivo y el desarrollo de fotobiorreactores de nueva generación, más eficientes, económicos y fáciles de operar y un aumento en la productividad del pigmento. Recientemente, se han efectuado intentos de mejoras de rendimiento mediante el empleo de compuestos químicos que potencien el crecimiento y la acumulación de bioproductos. Para incrementar la producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*, se ha descrito el efecto de fitohormonas y análogos (ácido giberélico, metil jasmonato, ácido salicílico y 2,4-epibrasinolida) en la regulación de la expresión de genes de la ruta biosintética (Yu et al. 2015).

Este trabajo ha permitido identificar cambios en metabolitos en condiciones de síntesis de astaxantina frente a una situación de no acumulación, constituyendo una aportación al conocimiento del mapa metabólico asociado a la síntesis de astaxantina en poblaciones de *Haematococcus pluvialis* morfológicamente homogéneas generadas en cultivo continuo. Esta información podría resultar de interés a la hora de diseñar posibles actuaciones de ingeniería metabólica, en la que la identificación previa de los compuestos implicados y las relaciones que se establecen entre ellos es de gran relevancia. La posibilidad de generar mutantes en enzimas relacionadas con la síntesis de estos metabolitos que potencien su efecto podría incrementar la producción de astaxantina.

CONCLUSIONES



A continuación se resumen las principales conclusiones obtenidas en este trabajo:

1. El sistema de cultivo continuo es adecuado para estudios metabólicos en *Haematococcus pluvialis* ya que permite mantener células en crecimiento activo pero con acumulación de astaxantina. Los factores que gobiernan el cultivo se mantienen constantes y por tanto aseguran la reproducibilidad de los datos.

2. La optimización de la metodología de CG-MS para ácidos orgánicos y azúcares combinando los métodos de detección *full scan* y SIM, permite su determinación con un alto nivel de sensibilidad.

3. Las condiciones que permiten disponer de cultivos en estado estacionario formado por células palmeloides que acumulan astaxantina son: velocidad de dilución de $0,8 \text{ d}^{-1}$, concentración de nitrato en el medio de aporte de 2 mM e irradiancia máxima de $2000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante el periodo de iluminación del ciclo solar simulado.

4. El estudio metabólico comparativo entre células que acumulan y que no acumulan astaxantina en respuesta a la limitación moderada de nitrógeno muestra que en condiciones de acumulación de astaxantina durante el periodo de iluminación se incrementa el contenido en cantaxantina, astaxantina, ácido linoleico y oleico, citrato, glucosa, fructosa y sacarosa, y disminuye el contenido en violaxantina, luteína, β -caroteno, ácido palmitoleico y linolénico, piruvato, oxaloacetato, succinato, malato, fumarato, α -cetoglutarato y trehalosa así como los aminoácidos asparagina, glutamina, alanina, ácido glutámico y aspártico.

5. Durante el periodo de oscuridad en condiciones de acumulación de astaxantina, se produce un incremento del contenido en cantaxantina, astaxantina, ácido palmítico, esteárico y oleico, α -cetoglutarato, citrato y sacarosa. En estas condiciones se produce una disminución del contenido en violaxantina, luteína, α y β -

caroteno, ácido mirístico, palmitoleico, linolénico y araquidónico, fructosa, glucosa, serina, glutamina, glicina y alanina.

En conjunto, estas modificaciones estarían relacionadas con la acumulación del pigmento que requiere ácido oleico para su esterificación, azúcares como fuente de energía y/o poder reductor para la síntesis y citrato como precursor de Acetil CoA y molécula reguladora.

6. Las células rojizas tienen una tasa de transporte de electrones (ETR (II)) y un rendimiento del fotosistema II (PSII (Y (II))) menor que las células verdes, y una mayor disipación de energía no fotoquímica en forma de calor (NPQ). Sin embargo, la maquinaria fotosintética es activa, con F_v/F_m sólo ligeramente inferior al de células verdes.

7. *Haematococcus pluvialis* acumula almidón en condiciones de limitación moderada de nitrógeno, acompañado de un engrosamiento de la pared celular y aumento de tamaño de las vesículas lipídicas, posiblemente debido a la acumulación de astaxantina en esas estructuras. Asimismo, las membranas tilacoidales permanecen ensambladas y se disponen rodeando los gránulos de almidón.

8. La limitación moderada de nitrógeno ha permitido obtener células con ligera acumulación de astaxantina, sin cambios acusados en la envuelta celular ni en el aparato fotosintético pero con cambios importantes en el contenido de algunos metabolitos que prepararían a la célula para la síntesis del pigmento.

BIBLIOGRAFÍA



Acién F.G., García, F., Sánchez, J.A., Fernández, J.M., Molina-Grima E., 1998. "Modelling of biomass productivity in tubular photo- bioreactors for microalgal cultures: effects of dilution rate, tube diameter and solar irradiance" *Biotechnology & Bioengineering* 58 (6): 605–616.

Aflalo C., Meshulam Y., Zarka A., Boussiba S. 2007. "On the relative efficiency of two-vs one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*" *Biotechnology and Bioengineering* 98: 300–305.

Algatech: www.algatech.com

American Type Culture Collection, (ATCC): www.atcc.org

Arnon D.I., McSwain B.D., Tsujimoto H.Y., Wada K. 1974. "Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 357 (2): 231–45.

Atherton H. J., Bailey N. J., Zhang W., Taylor J., Major H., Shockcor J., Clarke K., Griffin J. L. 2006. "A combined 1H-NMR spectroscopy- and mass spectrometry-based metabolomic study of the PPAR- Null mutant mouse defines profound systemic changes in metabolism linked to the metabolic syndrome" *Physiological Genomics* 27 (2): 178–86.

Baker N. R., 2008. "Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo" *Annual Review of Plant Biology* 59 (1): 89–113.

Betancort Rodríguez J.R., García Reina G., Santana Rodríguez J.J. 1997. "Determination of free amino acids in microalgae by high-performance liquid

chromatography using pre-column fluorescence derivatization" *Biomedical Chromatography* 11 (6): 335–36.

Bölling C., Fiehn O. 2005. "Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation" *Plant Physiology* 139: 1995–2005.

Borowitzka M.A., Huisman J.M., Osborn A. 1991. "Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. Effects of nutrients on growth and cell type" *Journal of Applied Phycology* 3 (4): 295–304.

Boussiba S. 2000. "Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response" *Physiologia Plantarum* 108: 111–17.

Boussiba S., Bing W., Yuan J.P., Zarka A., Chen F. 1999. "Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses" *Biotechnology Letters* 21: 601–4.

Boussiba S., Fan L., Vonshak A. 1991. "Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*" *Plant and Cell Physiology* 32 (7): 1077–82.

Boussiba S., Fan L., Vonshak A. 1992. "Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*" *Methods in Enzymology* 213: 386–91.

Breithaupt D.E. 2007. "Modern application of xanthophylls in animal feeding - a review" *Trends in Food Science and Technology* 18 (10): 501–6.

Bromke M.A., Sabir J.S., Alfassi F.A., Hajarrah N.H., Kabli S.A., Al-Malki A.L., Ashworth M.P., Méret M., Jasen R.K., Willmitzer L. 2015. "Metabolomic profiling of 13



diatom cultures and their adaptation to nitrate-limited growth conditions" *PLoS ONE* 10 (10): 1–17.

Bubrick P. 1991. "Production of astaxanthin from *Haematococcus*" *Bioresource Technology* 38 (2–3): 237–39.

Business Communications Company, Inc.: www.bccresearch.com

Camacho Kurmen J.E., González G., Klotz B. 2013. "Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés" *Nova* 11 (19): 91–102.

Capelli B., Cysewski G.R. 2013. "The world's best kept health secret natural astaxanthin" *Journal of Chemical Information and Modeling*. Vol. 53: 132; 133–135.

Carney L.T., Lane T.W. 2014. "Parasites in algae mass culture" *Frontiers in Microbiology* 5: 278.

Córdoba-Castro N.M., Acero-Reyes N.L., Duque-Buitrago L.F., Jiménez-Aguilar L.J., Serna-Jiménez J.A. 2015. "Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*" *UGCiencia* 21: 73–82.

Cerón M.C, García-Malea M.C, Rivas J., Acien F.G, Fernández J.M., Del Río E., Guerrero M.G., Molina E. 2007. "Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content." *Applied Microbiology and Biotechnology* 74 (5): 1112–19.

Chaumont D., Thépenier C. 1995. "Carotenoid content in growing cells of *Haematococcus pluvialis* during a sunlight cycle" *Journal of Applied Phycology* 7: 529–37.

Chen, G. 2007. "Lipid and fatty acid composition and their biosyntheses in relation to carotenoid accumulation in the microalgae *Nitzschia laevis* (Bacillariophyceae) and *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)" Ph.D. dissertation, *The University of Hong Kong, Hong Kong*, 150 pp.

Chen G., Wang B., Han D., Sommerfeld M., Lu Y., Chen F., Hu Q. 2015. "Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)" *Plant Journal* 81 (1): 95–107.

Chen T., Dong W., Chen G., Wang Y., Chen F. 2009. "Employment of organic acids to enhance astaxanthin formation in heterotrophic *Chlorella zofingiensis*" *Journal of Food Processing and Preservation* 33: 271–84.

Chen Z., Guangce W., Jianfeng N. 2012. "Variation in Rubisco and other photosynthetic parameters in the life cycle of *Haematococcus pluvialis*" *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 30 (1): 136–45.

Cordero B., Otero A., Patiño M., Arredondo B.O., Fábregas J. 1996. "Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions" *Biotechnology Letters* 18 (2): 213–18.

Cysewski G.R., Todd Lorenz R. 2004. "Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – species of high potential: *Haematococcus*" In *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, 281–88.

Danxiang H., Li Y., Hu Q. 2013. "Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications." *Algae* 28 (2): 131–47.



Danxiang H., Wang J., Sommerfeld M., Hu Q. 2012. "Susceptibility and protective mechanisms of motile and non motile cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) to photooxidative stress." *Journal of Phycology* 48 (3): 693–705.

Del Campo J.A., Moreno J., Rodríguez H., Vargas M.A., Rivas J., Guerrero M.G. 2000. "Carotenoid content of Chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta)" *Journal of Biotechnology* 76 (1): 51–59.

Del Campo J.A., Rodríguez H., Moreno J., Vargas M.A., Rivas J., Guerrero M.G. 2004. "Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta)" *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (6): 848–54.

Del Campo J.A., García-González M., Guerrero M.G. 2007. "Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 1163-1174

Del Río E. 2007. "Producción de astaxantina por la microalga *Haematococcus pluvialis* en cultivo continuo. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.

Del Río E., Acién F.G., García-Malea M.C., Rivas J., Molina-Grima E., Guerrero M.G. 2005. "Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture" *Biotechnology and Bioengineering* 91 (7): 808–15.

Del Río E., Acién F.G., García-Malea M.C., Rivas J., Molina-Grima E., Guerrero M.G. 2008. "Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis*" *Biotechnology and Bioengineering* 100 (2): 397–402.

Del Río E., García-Gómez E., Moreno J., Guerrero M.G., García-González M. 2017. "Microalgae for oil. Assessment of fatty acid productivity in continuous culture

by two high-yield strains, *Chlorococcum oleofaciens* and *Pseudokirchneriella subcapitata*" *Algal Research* 23: 37–42.

Demmig-Adams B., Adams W.W. 2002. "Antioxidants in photosynthesis and human nutrition" *Science* 298 (5601): 2149–53.

Demmig-Adams B., Gilmore A.M., Adams W.W. 1996. "In vivo functions of carotenoids in higher plants" *Faseb Journal* 10(4): 403–12.

Derrien A., Coiffard Laurence J.M., Coiffard C., De Roeck-Holtzhauer Y. 1998. "Free amino acid analysis of five microalgae" *Journal of Applied Phycology* 10 (2): 131–34.

Di Mascio P., Murphy M.E., Sies H. 1991. "Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols" *The American Journal of Clinical Nutrition* 53 (1): 194S–200S.

Dong Keon K., Seong Joo H., Jae Han B., Narae Y., EonSeon J., Choul Gyun L. 2011. "Transcriptomic analysis of *Haematococcus lacustris* during astaxanthin accumulation under high irradiance and nutrient starvation" *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16 (4): 698–705.

Domínguez A., Ferreira M., Coutinho P., Fábregas J., Otero A. 2005. "Delivery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* to the aquaculture food chain" *Aquaculture* 250 (1–2): 424–30.

Domínguez A., Fábregas J., Otero A. 2006. "Astaxantina, el oro rojo de la microalga *Haematococcus pluvialis*" *Algas. Boletín de La Sociedad Española de Ficología* 35: 4–8.



Domínguez-Bocanegra A.R., Ponce-Noyola T., Torres-Muñoz J.A. 2007. "Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study" *Applied Microbiology and Biotechnology* 75 (4): 783–91.

Droop M. R. 1954. "Conditions governing haematochrome formation and loss in the alga *Haematococcus pluvialis* flotow" *Archiv Für Mikrobiologie* 20 (4): 391–97.

Elliot A.M. 1934. "Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*" *Arch Protistenk* 82: 250–272.

EonSeon J., Polle Juergen E.W., Hong Kum L., Hyun S.M., Chang M. 2003. "Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application" *Microbial Biotechnology* 13(2):165-174.

Fábregas J., Otero A., Maseda A., Domínguez A. 2001. "Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*" *Journal of Biotechnology* 89: 65–71.

Fábregas J., Domínguez A., Maseda A., Otero A. 2003. "Interactions between irradiance and nutrient availability during astaxanthin accumulation and degradation in *Haematococcus pluvialis*" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61(5-6): 545-551.

Fernández Segovia I., García Martínez E.M. 2005. "Cuantificación de compuestos por cromatografía: método del patrón interno" Universitat Politècnica de València. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Artículo docente.

Fontes A.G., Vargas M.A., Moreno J., Guerrero M.G, Losada M. 1987. "Factors affecting the production of biomass by a nitrogen-fixing blue-green alga in outdoor culture" *Biomass* 13 (1): 33–43.

García-Malea M.C., Acién F.G., Fernández J.M., Cerón M.C., Molina-Grima E. 2006. "Continuous production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: Modeling of the irradiance effect" *Enzyme and Microbial Technology* 38 (7): 981–89.

García-Malea M.C. 2006. "Optimización de un proceso de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*" Tesis doctoral. Universidad de Almería.

García-Malea, M.C., Acién F.G., Del Río E., Fernández J.M., Cerón M.C., Guerrero M.G, Molina-Grima E. 2009. "Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: Taking the one-step System outdoors" *Biotechnology and Bioengineering* 102 (2): 651–57.

Goodwin, T. W. 1980. Nature and distribution of carotenoids. *Food Chemistry* 5: 3-13.

Gong M., Bassi A. 2016. "Carotenoids from microalgae: A review of recent developments" *Biotechnology Advances* 34 (8): 1396-1412.

Grünwald K., Eckert M., Hirschberg J., Hagen C. 2000. "Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae)" *Plant Physiology* 122 (4): 1261–68.

Grünwald K., Hirschberg J., Hagen C. 2001. "Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*" *Journal of Biological Chemistry* 276 (8): 6023–29.

Gu W., Xie X., Gao S., Zhou W., Pan G., Wang G. 2013. "Comparison of different cells of *Haematococcus pluvialis* reveals an extensive acclimation mechanism during its aging process: from a perspective of photosynthesis" *PLoS ONE* 8 (6): 1–10.



Gu W., Li H., Zhao P., Yu R., Pan G., Gao S., Xie X., Huang A., He L., Wang G. 2014. "Quantitative proteomic analysis of thylakoid from two microalgae (*Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina*) reveals two different high light-responsive strategies" *Scientific Reports* 4: 1–12.

Guerin M., Huntley M.E., Olaizola M. 2003. "*Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition" *Trends in Biotechnology* 21 (5): 210–16.

Guerrero M.G., Vega J.M., Losada M. 1981. "The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation" *Annual Review of Plant Physiology* 32: 169–204.

Hagen C., Siegmund S., Braune W. 2001. "Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation" *European Journal of Phycology* 37: 217–26.

Hazen T.E. 1899. "The life history of *Sphaerella lacustris* (*Haematococcus pluvialis*)" *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 6 (3): 211–46.

Heinrikson R.L., Meredith S.C. 1984. "Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate" *Analytical Biochemistry* 136 (1): 65–74.

Higuera-Ciapara I., Félix-Valenzuela L., Goycoolea F.M. 2006. "Astaxanthin: a review of its chemistry and applications" *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46 (2): 185–96.

Holtin K., Kuehnle M., Rehbein J., Schuler P., Nicholson G., Albert K. 2009. "Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI)MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy" *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395 (6): 1613–22.

Hoskisson P.A., Hobbs G. 2005. "Continuous culture - making a comeback?" *Microbiology* 151 (10): 3153–59.

Huang J.C., Chen F., Sandmann G. 2006. "Stress-related differential expression of multiple β -carotene ketolase genes in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*" *Journal of Biotechnology* 122(2): 176-85.

Huang W., Ye J., Zhang J., Lin Y., He M., Huang J. 2016. "Transcriptome analysis of *Chlorella zofingiensis* to identify genes and their expressions involved in astaxanthin and triacylglycerol biosynthesis" *Algal Research* 17: 236-243.

Huang L., Gao B., Wu M., Wang F., Zhang C. 2019. "Comparative transcriptome analysis of a long-time span two-step culture process reveals a potential mechanism for astaxanthin and biomass hyper-accumulation in *Haematococcus pluvialis* JNU35" *Biotechnology for Biofuels* 12:18

Hussein G., Sankawa U., Goto H., Matsumoto K., Watanabe H. 2006. "Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition" *Journal of Natural Products* 69: 443–49.

Imura M., Iwakiri R., Bamba T., Fukusaki E. 2018. "Metabolomics approach to reduce the Crabtree effect in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae*" *Journal of Bioscience and Bioengineering* 126 (2): 183–88.

Jamers A., Blust R., De Coen W. 2009. "Omics in algae: paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena?" *Aquatic Toxicology* 92 (3): 114–21.



Jin H., Lao Y.M., Zhou J., Zhang H.J., Cai Z.H. 2017. "Simultaneous determination of 13 Carotenoids by a simple C18 column-based ultra-high-pressure liquid chromatography method for carotenoid profiling in the astaxanthin-accumulating *Haematococcus pluvialis*" *Journal of Chromatography A* 1488. 93–103.

Kakizono T., Kobayashi M., Nagai S. 1992. "Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*" *Journal of Fermentation and Bioengineering* 74 (6): 403–5.

Kendrick A., Ratledge C. 1992. "Desaturation of polyunsaturated fatty-acids in *Mucor circinelloides* and the involvement of a novel membrane bound malic enzyme" *European Journal of Biochemistry* 209 (2): 667-73.

Kim J.H., Affan A., Jang J., Kang M.H., Ko A.R., Jeon S.M., Oh C., Heo S.J., Lee Y.H., Ju S.J., Kang D.H. 2015. "Morphological, molecular, and biochemical characterization of astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus* sp. KORDI03 (*Haematococcaceae*, Chlorophyta) isolated from Korea" *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25 (2): 238–46.

Klochkova T.A., Kwak M.S., Han J.W., Motomura T., Nagasato C., Kim G.H. 2013. "Cold-tolerant strain of *Haematococcus pluvialis* (*Haematococcaceae*, Chlorophyta) from Blomstrandhalvøya (Svalbard)" *Algae* 28 (2): 185–92.

Kobayashi M., Kakizono T., Nagai S. 1991. "Astaxanthin production by a green-alga, *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate medium" *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71 (5): 335–39.

Kobayashi M., Katsuragi T., Tani Y. 2001. "Enlarged and astaxanthin-accumulating cyst cells of the green alga *Haematococcus pluvialis*" *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92 (6): 565–68.

Kobayashi M., Kurimura Y., Kakizono T., Nishio N., Tsuji Y. 1997. "Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluviialis*" *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84 (1): 94–97.

Kombu R.S., Brunengraber H., Puchowicz M.A. 2011. "Analysis of the citric acid cycle intermediates using gas chromatography-mass spectrometry" *Methods in molecular biology* 708:147-57.

Lee D.Y., Park J.J., Barupal D.K., Fiehn O. 2012. "System response of metabolic networks in *Chlamydomonas reinhardtii* to total available ammonium" *Molecular & Cellular Proteomics* 11 (10): 973–88.

Lee D.Y., Fiehn O. 2008. "High quality metabolomics data for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Methods* 4

Lee Y.K., Ding S.Y. 1994. "Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta)" *Journal of Phycology* 30 (3): 445–49.

Lemoine Y., Schoefs B. 2010. "Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress" *Photosynthesis Research* 106: 155–77.

Li Y., Junchao Huang J., Sandmann G., Chen F. 2008. "Glucose sensing and the mitochondrial alternative pathway are involved in the regulation of astaxanthin biosynthesis in the dark-grown *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyceae)" *Planta* 228 (5): 735–43.

Lichtenthaler H.K., Rohmer M., Schwender J. 1997. "Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants" *Plant Physiology*. 101: 643–652.



Liu J., Sun Z., Gerken H., Liu Z., Jiang Y., Chen F. 2014. "Chlorella zofingiensis as an alternative microalgal producer of astaxanthin: biology and industrial potential" *Marine Drugs* 12(6): 3487-515.

López-Roldán P., Mach N. 2012. "Efecto del consumo de astaxantina en la salud" *Rev Esp Nutr Comunitaria* 18(3): 164-177.

Lorenz R.T., Cysewski, G.R. 2000. "Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin" *Trends Biotechnol.* 18 (4): 160–167.

Lv H., Miao Liu F.X., Cui X., Wahid F., Jia S. 2016. "Metabolomic profiling of the astaxanthin accumulation process induced by high light in *Haematococcus pluvialis*" *Algal Research* 20: 35–43.

Margalith P.Z. 1999. "Production of ketocarotenoids by microalgae" *Applied Microbiology and Biotechnology* 51 (4): 431–38.

Masojídek J., Torzillo G., Koblížek M. 2013. "Photosynthesis in microalgae" *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 21–36.

Matsuo T., Ishiura M. 2010. "New insights into the circadian clock in *Chlamydomonas*" *International Review of Cell and Molecular Biology* 280:281-314.

Mínguez-Mosquera M.I., Gandul-Rojas B., Gallardo-Guerrero M.L. 1992. "Rapid method of quantification of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by high-performance liquid chromatography" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 60–63.

Mocquet C., Bernard O., Sciandra A. 2010. "Cell cycle modeling of microalgae grown under a light-dark signal" *IFAC Proceedings Volumes* 11:174–79.

Nelson D.L., Cox M.M. 2008. "Lehninger Principles of Biochemistry" 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company.

Nguyen K.D. 2013. "Astaxanthin: a comparative case of synthetic vs natural production" *Chemical and Biomolecular Engineering Publications and Other Works* 1–9.

Ohlrogge J.B., Jaworski J.G. 1997. "Regulation of fatty acid synthesis" *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:109-136.

Olaizola M. 2003. "Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace" *Biomolecular Engineering* 20:459–66.

Orata F. 2012. "Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis" *Advanced Gas Chromatography – Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications* 83–156.

Orosa M., Franqueira D., Cid A., Abalde J. 2001. "Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth" *Biotechnology Letters* 23 (5): 373–78.

Orosa M., Franqueira D., Cid A., Abalde J. 2005. "Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*" *Bioresource Technology* 96: 373–78.

Osanai T., Oikawa A., Tomokazu Shirai T., Kuwahara A., Iijima H., Tanaka K., Ikeuchi M., Kondo A., Saito K., Hirai M.Y. 2014. "Capillary electrophoresis-mass spectrometry reveals the distribution of carbon metabolites during nitrogen starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803" *Environmental Microbiology* 16 (2): 512–24.



Pedersen K. J. 1952. "The uncatalysed and the metal-ion catalysed decarboxylation of oxaloacetic acid" *Acta chemica Scandinavica* 6: 285-303.

Peebles F. 1909. "The life history of *Sphaerella lacustris* (*Haematococcus pluvialis*) with special reference to the nature and behaviour of the zoospores" *Über Tabaksfermentation* 511–521.

Ping H., Duncan J., Barber J. 2007. "Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*: effects of cultivation parameters" *Journal of Integrative Plant Biology* 49 (4): 447–51.

Pirt S.J., Lee Y. K., Richmond A., Watts Pirt M. 1980. "The photosynthetic efficiency of *Chlorella* biomass growth with reference to solar energy utilization" *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 30: 25 – 34.

Poliner E., Panchy N., Newton L., Wu G., Lapinsky A., Bullard B., Zienkiewicz A., Benning C., Shiu S.H., Farré E.M. 2015. "Transcriptional coordination of physiological responses in *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 under light/dark cycles" *Plant Journal* 83 (6): 1097–1113.

Ramírez Landínez D.M. 2013. "Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift" Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia.

Recht L., Töpfer N., Batushansky A., Noga Sikron N., Gibon Y., Fait A., Nikoloski Z., Boussiba S., Zarka A. 2014. "Metabolite profiling and integrative modeling reveal metabolic constraints for carbon partitioning under nitrogen starvation in the green algae *Haematococcus pluvialis*" *Journal of Biological Chemistry* 289 (44): 30387–403.

Recht L., Zarka A., Boussiba S. 2012. "Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp." *Applied Microbiology and Biotechnology* 94 (6): 1495–1503.

Rioboo C., González-Barreiro O., Abalde J., Cid A. 2011. "Flow cytometric analysis of the encystment process induced by paraquat exposure in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)" *European Journal of Phycology* 46 (2): 89–97.

Rodríguez-Ruiz J., Belarbi E.H., Garcia Sánchez J.L., López Alonso D. 1998. "Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses" *Biotechnology Techniques* 12 (9): 689–91.

Roessner U. 2001. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems" *Plant Cell* 13 (1): 11–29.

Roháček K., Barták M. 1999. "Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications" *Photosynthetica* 37(3): 339-363

Ruiz-Matute A.I., Hernández-Hernández O., Rodríguez-Sánchez S., Sanz M.L., Martínez-Castro I. 2011. "Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses" *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 879 (17–18): 1226–40.

Santos M.F., Mesquita J.F. (1984). "Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales). 1. Some aspects of carotenogenesis" *Cytologia* 49: 215-228.

Schoefs B., Rmiki N.E., Rachadi J., Lemoine Y. 2001. "Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids" *FEBS Letters* 500 (3): 125–28.



Serrano-Bueno G., Romero-Campero F.J., Lucas-Reina E., Romero J.M., Valverde F. 2017. "Evolution of photoperiod sensing in plants and algae." *Current Opinion in Plant Biology* 37: 10–17.

Shah M.M., Liang Y., Cheng J.J., Daroch M. 2016. "Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products" *Frontiers in Plant Science* 7: 531.

Shtaida N., Khozin-Goldberg I., Boussiba S. 2015. "The role of pyruvate hub enzymes in supplying carbon precursors for fatty acid synthesis in photosynthetic microalgae" *Photosynthesis Research* 125 (3): 407–22.

Schmidt I., Schewe H., Gassel S., Jin Ch., Buckingham J., Hümbelin M., Sandmann G., Jens Schrader J. 2011. "Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*" *Appl Microbiol Biotechnol* 789: 555–71.

Solovchenko A.E. 2015. "Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation by microalgal cell" *Photosynthesis Research* 125 (3): 437–49.

Steinbrenner J., Linden H. 2001. "Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*" *Plant Physiology* 125 (2):810-817.

Su Y., Wang J., Shi M., Niu X., Yu X., Gao L., Zhang X., Chen L., Zhang W. 2014. "Metabolomic and network analysis of astaxanthin-producing *Haematococcus pluvialis* under various stress conditions" *Bioresource Technology* 170: 522–29.

Sweetlove L.J., Beard K.F., Nunes-Nesi A., Fernie A.R., Ratcliffe R.G. 2010. "Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle" *Trends in Plant Science* 15 (8): 462–70.

Tjahjono A.E., Hayama Y., Kakizono T., Terada Y., Nishio N., Nagai S. 1994. "Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluviialis* at elevated temperatures" *Biotechnology Letters* 16 (2): 133–38.

Triki A., Maillard P., Gudin C. 1997. "Gametogenesis in *Haematococcus pluviialis* floto (Volvocales, Chlorophyta)" *Phycologia* 36 (3): 190–94.

Tschoep H., Gibon Y., Carillo P., Armengaud P., Szecowka M., Nunes-Nesi A., Fernie A.R., Koehl K., Stitt M. 2009. "Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in *Arabidopsis*" *Plant Cell and Environment* 32(3): 300–318.

Valledor L., Furuhashi T., Recuenco-Muñoz L., Wienkoop E., Weckwerth W. 2014. "System-level network analysis of nitrogen starvation and recovery in *Chlamydomonas reinhardtii* reveals potential new targets for increased lipid accumulation" *Biotechnology for Biofuels* 7: 171

Varela J.C., Pereira H., Vila M., León R. 2015. "Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges" *Photosynthesis Research* 125(3): 423–36.

Vendruscolo R.G., Xavier Facchi M., Manzoni Maroneze M., Bittencourt Fagundes M., Cichoski A.J., Queiroz Zepka L., Smaniotto Barin J., Jacob-Lopes E., Wagner R. 2018. "Polar and non-polar intracellular compounds from microalgae: methods of simultaneous extraction, gas chromatography determination and comparative analysis" *Food Research International* 109: 204–12.



Veyel D., Erban A., Fehrle I., Kopka J., Schroda M. 2014. "Rationales and approaches for studying metabolism in eukaryotic microalgae" *Metabolites* 4(2): 184-217.

Vidhyavathi R., Venkatachalam L., Ravi Sarada R., Ravishankar G.A. 2008. "Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions" *Journal of Experimental Botany* 59 (6): 1409–18.

Wang B., Zhang Z., Hu Q., Sommerfeld M., Lu Y., Han D. 2014. "Cellular capacities for high-light acclimation and changing lipid profiles across life cycle stages of the green alga *Haematococcus pluvialis*" *PLoS ONE* 15 (9).

Wang B., Yang S., Chen G., Wu Y., Hou Y., Xu G. 2008. "Simultaneous determination of non-volatile, semivolatile, and volatile organic acids in tobacco by SIM-scan mode GC-MS" *Journal of Separation Science* 31 (4): 721–26.

Wang S.B., Qiang Hu Q., Milton Sommerfeld M., Chen F. 2004. "Cell wall proteomics of the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae)" *Proteomics* 4 (3): 692–708.

Wase N., Black P.N., Stanley B.A., DiRusso C.C. 2014. "Integrated quantitative analysis of nitrogen stress response in *Chlamydomonas reinhardtii* using metabolite and protein profiling" *Journal of Proteome Research* 13 (3): 1373–96.

Wayama M., Ota S., Matsuura H., Nango N., Hirata A., Kawano S. 2013. "Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*" *PLoS ONE* 8 (1): 1–9.

Weesepoel Y., Vincken J.P., Pop R.M., Liu K., Gruppen H. 2013. "Sodiation as a tool for enhancing the diagnostic value of MALDI-TOF/TOF-MS spectra of complex

astaxanthin ester mixtures from *Haematococcus pluvialis*" *Journal of Mass Spectrometry* 48 (7): 862–74.

Wienkoop S., Weiß J., May P., Kempa S., Irgang S., Recuenco-Munoz L., Pietzke M. 2010. "Targeted proteomics for *Chlamydomonas reinhardtii* combined with rapid subcellular protein fractionation, metabolomics and metabolic flux analyses" *Molecular BioSystems* 6 (6): 1018.

Willamme R., Alsafrá Z., Arumugam R., Eppe G., Remacle F., Levine R.D., Remacle C. 2015. "Metabolomic analysis of the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated under day/night conditions" *Journal of Biotechnology* 215: 20–26.

Xiong W., Liu L., Wu C., Yang C., Wu Q. 2010. "13C-tracer and gas chromatography-mass spectrometry analyses reveal metabolic flux distribution in the oleaginous microalga *Chlorella protothecoides*" *Plant Physiology* 154 (2): 1001–11.

Xue J., Wang L., Zhang L., Balamurugan S., Da-Wei L., Zeng H., Yang W., Liu J.S., Li H.Y. 2016. "The pivotal role of malic enzyme in enhancing oil accumulation in green microalga *Chlorella pyrenoidosa*" *Microbial Cell Factories* (1) 15:120.

Yu X., Niu X., Zhang X., Pei G., Liu J., Chen L., Zhang W. 2015. "Identification and mechanism analysis of chemical modulators enhancing astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*" *Algal Research* 11: 284–93.

Yuan J.P., Peng J., Yin K., Wang H. 2011. "Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae" *Molecular Nutrition and Food Research* 55 (1): 150–65.



Zhang B.Y., Geng Y.H., Li Z.K., Hu H.J., Li Y.G. 2009. "Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process" *Aquaculture* 295 (3–4): 275–81.

Zhang Z., Wang B., Hu Q., Sommerfeld M., Li Y., Han D. 2016. "A new paradigm for producing astaxanthin from the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*" *Biotechnology and Bioengineering* 113 (10): 2088–99.

Zhang Z., Sun D., Zhang Y., Chen F. 2019. "Glucose triggers cell structure changes and regulates astaxanthin biosynthesis in *Chromochloris zofingiensis*" *Algal Research* 39: 1-7

Zhekisheva M., Boussiba S., Khozin-Goldberg I., Zarka A., Cohen Z. 2002. "Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters" *Journal of Phycology* 38 (2): 325–31.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de algunos carotenoides.	17
Figura 2. Esteroisómeros de la molécula de astaxantina.	19
Figura 3. Evolución del mercado de carotenoides (millones de dólares) en el periodo 2010 – 2018. Fuente: BBC Research.	25
Figura 4. Morfotipos de <i>Haematococcus pluvialis</i> A: célula flagelada o macrozoote. B: célula palmeloide. C: Célula palmeloide en transición a quiste. D: quiste o aplanospora. Escala 10 µm (Shah et al 2016).	27
Figura 5. Microzooides antes y después de ser liberados. Fuente: Triki et al. 1997	27
Figura 6. Ciclos de <i>Haematococcus pluvialis</i> . Fuentes: modificado de Kobayashi et al. 1997 (A) y Domínguez et al. 2006 (B)	28
Figura 7. Síntesis de astaxantina en el cloroplasto. Abreviaturas: DOXP: 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato, MEP: 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato, HMBPP: hidroximetil butenil difosfato, IPP: isopentenil difosfato, DMAPP: dimetilalil difosfato, GGPP: geranil geranil pirofosfato. Fuente: modificada de Chacón Ordóñez y Esquivel Rodríguez 2013.	30
Figura 8. Diagrama de flujo del proceso de producción de astaxantina natural a partir de <i>Haematococcus pluvialis</i> . Fuente: Cyanotech (www.cyanotech.com/astaxanthin/astaxanthin-process/).	34
Figura 9. Cultivo masivo de <i>Haematococcus pluvialis</i> para producir astaxantina mediante el sistema en dos etapas en un estanque abierto. Fuente: Cyanotech (www.cyanotech.com/astaxanthin/astaxanthin-process/).	35
Figura 10. Cultivo estanco en cámara climatizada.	46
Figura 11. Instalación de reactores tipo columna de burbujeo.	47
Figura 12. Esquema del reactor tipo columna de burbujeo.	48
Figura 13. Vista frontal del sistema de iluminación (A y B) y vista superior (C) de la disposición de los fluorescentes sobre los paneles. Fuente: Del Río et al. 2017.	49
Figura 14. Esquema de la preparación de los extractos de <i>Haematococcus pluvialis</i> para el análisis de ácidos orgánicos mediante CG-MS. MCW: metanol-cloroformo-agua; MBB: Mini Bead Beater; SB: sobrenadante.	53

Figura 15. Medidas de irradiancia en el transcurso del ciclo solar simulado. Irradiancia máxima $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Comienzo del periodo de iluminación: 9.00 a.m. Fin del periodo de iluminación: 21.00 p.m.63

Figura 16. Cultivos de *Haematococcus pluvialis* crecidos en medio Arnon (izquierda) y Medio Inorgánico (derecha). Condiciones experimentales: velocidad de dilución $0,3 \text{ d}^{-1}$, ciclo solar simulado $I_{0 \text{ MAX}} 2500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nitrato en el medio de aporte 15 mM68

Figura 17. Influencia de la concentración de nitrato en el medio de aporte y velocidad de dilución sobre la biomasa de *Haematococcus pluvialis* en cultivo continuo. Condiciones experimentales: temperatura 25°C , pH 7, ciclo solar simulado $I_{0 \text{ MAX}} 2500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y caudal de aire $16,7 \text{ l aire (l cultivo)}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de iluminación. Se muestra el error estándar para $n=4$69

Figura 18. Influencia de la concentración de nitrato en el medio de aporte y velocidad de dilución sobre el contenido de astaxantina de la biomasa de *Haematococcus pluvialis* en cultivo continuo. Condiciones experimentales descritas en la Figura 17. Se muestra el error estándar para $n=4$70

Figura 19. Influencia del suministro específico de nitrato (SEN) sobre el contenido de astaxantina de *Haematococcus pluvialis* en cultivo continuo.71

Figura 20. Correlación entre los contenidos en nitrógeno y astaxantina de la biomasa de *Haematococcus pluvialis* en cultivo continuo.73

Figura 21. Morfología de cultivos *Haematococcus pluvialis* a distintas velocidades de dilución y concentraciones de nitrato. Condiciones experimentales descritas en la Figura 17. Barra de tamaño $20 \mu\text{m}$ igual para todas las imágenes.75

Figura 22. Evolución de la morfología celular de cultivos en limitación (2 mM nitrato) de *Haematococcus pluvialis* sometidos a ciclos de luz-oscuridad ($12:12$, $1300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en estado estacionario. **A y D:** 1º día estado estacionario; **B y E:** 6º día; **C y F:** 12º día. Condiciones experimentales: velocidad de dilución $0,7 \text{ d}^{-1}$ (columna izquierda) y $0,8 \text{ d}^{-1}$ (columna derecha). Resto de condiciones descritas en la Figura 17. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de iluminación. Barra de tamaño $20 \mu\text{m}$ igual para todas las imágenes.77

Figura 23. Evolución de la morfología celular de cultivos con acumulación de astaxantina (2 mM nitrato) de *Haematococcus pluvialis* sometidos a ciclo solar simulado ($I_{0 \text{ MAX}} 2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante el estado estacionario. **A y D:** 1º día estado estacionario; **B y E:** 6º día; **C y F:** 12º día. Condiciones experimentales: velocidad de dilución $0,7 \text{ d}^{-1}$ (columna izquierda) y $0,8 \text{ d}^{-1}$ (columna derecha) Resto de condiciones

descritas en la Figura 17. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de iluminación. Barra de tamaño 20 μm igual para todas las imágenes.....78

Figura 24. Perfil de la mezcla de estándares de ácidos orgánicos (200 μM). Patrón interno: ribitol (40 μM) *Oxima del ácido pirúvico. ** Oxima del G3P. ***Metil-oxima del G3P. Resto de picos no identificados correspondientes a residuos de la derivatización.80

Figura 25. A: GC–MS (*full scan*). Perfil de una mezcla de estándares de ácidos orgánicos (100 μM). **B:** GC–MS (SIM) cromatograma del ión 73 (m/z) monitorizado en el intervalo 7,70-7,90 min correspondiente al ácido α -cetoglutarico.81

Figura 26. Captura de pantalla realizada en el CG-MS donde se muestra la superposición de los cuatro picos resultantes del análisis de ácido oxalacético/ácido pirúvico 200 - 400 μM . (Rosa: ácido oxalacético 400 μM ; Marrón: ácido pirúvico 400 μM ; Negro: ácido oxalacético 200 μM ; Azul: ácido pirúvico 200 μM). El segundo pico mostrado a RT 3,87 minutos corresponde a un residuo de la derivatización. Eje de ordenadas, intensidad; Eje de abscisas, tiempo de retención.82

Figura 27. Descomposición del OAA en ácido pirúvico. **(1)** Descarboxilación del OAA en CO_2 y forma “enol” del ácido pirúvico. **(2)** Transformación de la forma enólica del ácido pirúvico en ácido pirúvico. Fuente: Pedersen 1952.....83

Figura 28. Perfiles de estándares de ácidos oxalacético **(A)** y pirúvico **(B)** (5 mM) monitorizada mediante HPLC.84

Figura 29. Perfiles de ácidos orgánicos de cultivos de *Haematococcus pluvialis* crecido a una velocidad de dilución de 0,8 d^{-1} en condiciones de suficiencia de nitrato (15 mM). **A:** GC–MS (*full scan*). **B:** GC–MS (SIM) cromatograma del ión 73 (m/z) del ácido fumárico. **C:** GC–MS (SIM) cromatograma del ión 73 (m/z) del ácido α -cetoglutarico. *Oxima del ácido pirúvico. Resto de picos no identificados corresponden a residuos de la derivatización.85

Figura 30. Cultivo continuo de *Haematococcus pluvialis* sin acumulación de astaxantina (15 mM de nitrato) **(A)** y con acumulación de astaxantina (2 mM de nitrato) **(B)**. Condiciones experimentales: velocidad de dilución 0,8 d^{-1} , temperatura 25 $^{\circ}\text{C}$, pH 7, ciclo solar simulado $I_{0\text{ MAX}} 2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y caudal de aire 16,7 l aire (l cultivo) $^{-1} \text{h}^{-1}$. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de iluminación.87

Figura 31. Cultivos de *Haematococcus pluvialis* sin acumulación de astaxantina (15 mM de nitrato) **(A)** y con acumulación de astaxantina (2 mM de nitrato) **(B)**. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30.88

- Figura 32.** Ultraestructura de *Haematococcus pluvialis* sin acumulación de astaxantina (15 mM de nitrato) (A) y con acumulación de astaxantina (2 mM de nitrato) (B). N, núcleo; C, cloroplasto; P, pirenoide; PC, pared celular; GA, gránulo de almidón; VL, vesícula lipídica. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30.89
- Figura 33.** Detalle de la ultraestructura de *Haematococcus pluvialis* sin acumulación de astaxantina (A) y con acumulación de astaxantina (B). C, cloroplasto; T, tilacoide; GA, gránulo de almidón; VL, vesícula lipídica; ECT, envuelta cristalina tripartita; PC, pared celular; ME, matriz extracelular. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30.89
- Figura 34.** Evolución de un cultivo sin acumulación de astaxantina (A, B, C y D) y con acumulación de astaxantina (E, F, G y H) de *Haematococcus pluvialis* durante el ciclo solar simulado. A y E: 2 horas desde el inicio del periodo de iluminación; B y F: 6 horas; C y G: 10 horas; D y H: 18 horas. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Barra de tamaño 20 µm igual para todas las imágenes. ZT: “Zero Time”.90
- Figura 35.** Análisis mediante citometría de flujo de la evolución de un cultivo de *Haematococcus pluvialis* sin acumulación de astaxantina (15 mM de nitrato) a lo largo del ciclo solar simulado. FSC (eje X): Tamaño celular. Count (eje Y): número de eventos. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30.....92
- Figura 36.** Análisis mediante microscopía óptica de la evolución de la morfología celular de un cultivo *Haematococcus pluvialis* sin acumulación de astaxantina (15 mM de nitrato) a lo largo del ciclo solar simulado. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Barra de tamaño 20 µm igual para todas las imágenes94
- Figura 37.** Análisis mediante citometría de flujo de la evolución de un cultivo de *Haematococcus pluvialis* con acumulación de astaxantina (2 mM de nitrato) a lo largo del ciclo solar simulado. FSC (eje X): Tamaño celular. Count (eje Y): número de eventos. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30.....96
- Figura 38.** Análisis mediante microscopía óptica de la evolución de la morfología celular de un cultivo *Haematococcus pluvialis* con acumulación de astaxantina (2 mM de nitrato) a lo largo del ciclo solar simulado. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Barra de tamaño 20 µm igual para todas las imágenes.98
- Figura 39.** Distribución del tamaño (% FSC) de células de *Haematococcus pluvialis* sin acumulación (A) y con acumulación de astaxantina (B) en función del ciclo solar. Barra negra en el eje de abscisas indicativa del periodo de oscuridad. Pequeñas (<20 µm); Medianas (20 – 45 µm); Grandes (>45 µm).100

Figura 40. Parámetros fotosintéticos a distintas intensidades lumínicas en muestras de cultivos de <i>Haematococcus pluvialis</i> sin acumulación (suficiencia de nitrógeno, 15 mM) y con acumulación de astaxantina (limitación de nitrógeno, 2 mM). A: tasa fotosintética de transporte de electrones del fotosistema II (ETR (II)); B: rendimiento cuántico del fotosistema II (Y (II)); C: energía disipada no fotoquímica (NPQ); PAR: radiación fotosintéticamente activa. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Se muestra el error estándar para n=2.	107
Figura 41: Diferencia de tamaño de células de <i>Haematococcus pluvialis</i> de cultivos continuos en estado estacionario. Condiciones experimentales: velocidad de dilución 0,8 d ⁻¹ , 2 mM NO ₃ ⁻ en el medio de aporte, temperatura 25 °C, pH 7, ciclo solar simulado I ₀ MAX 2000 μE m ⁻² s ⁻¹ y caudal de aire 16,7 l aire (l cultivo) ⁻¹ h ⁻¹	123
Figura 42: Ruta de síntesis de carotenoides a partir del licopeno en <i>Haematococcus pluvialis</i> (modificada de Shah et al. 2016). Se destaca en rojo los carotenoides que disminuyen sus niveles intracelulares y en azul los que aumentan en las células palmeloides rojizas en comparación con las células verdes. Los compuestos que no se destacan no se detectaron. BKT: β-caroteno cetolasa; CrtR-b: β-caroteno hidroxilasa.	125
Figura 43: Mecanismo propuesto de la redistribución del carbono del TCA en la biosíntesis de ácidos grasos mediante la migración del malato desde la mitocondria al cloroplasto. (Fuente: modificada de Recht et al. 2014).	133
Figura 44: Lanzadera de grupos acetilo en forma de citrato desde la mitocondria al citosol (Fuente: Nelson and Cox 2008).	134
Figura 45. Esquema del metabolismo central en <i>Haematococcus pluvialis</i> . En rojo se muestran los metabolitos que disminuyen sus niveles intracelulares, en azul los que aumentan y en verde los que no muestran diferencias significativas en situación de acumulación de astaxantina en relación a situaciones sin acumulación del pigmento. Los compuestos en negro no se han determinado.	137

Tabla 1. Composición del sustrato inorgánico.	43
Tabla 2. Composición de la solución de metales traza.....	43
Tabla 3. Composición de la solución de vitaminas.....	44
Tabla 4. Composición final del Medio Inorgánico.	45
Tabla 5. Iones selectivos para operar en modo SIM.	57
Tabla 6. Contenido en nitrógeno de la biomasa (%) en función de la concentración de nitrato (mM) en el medio de aporte y velocidad de dilución impuesta (d^{-1}) en cultivo continuo. Condiciones experimentales descritas en la Figura 17.	72
Tabla 7. Condiciones de detección en modo SIM para ácidos fumárico y α -cetoglutarico en muestras de <i>Haematococcus pluvialis</i>	85
Tabla 8. Contenido en carotenoides (expresado como % en la biomasa) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de <i>Haematococcus pluvialis</i> . Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Se muestra el error estándar para n=8 en el caso de los cultivos en suficiencia (15 mM) y n=16 para los cultivos en limitación de nitrato (2 mM). Las diferencias son significativas para $p<0,05$	102
Tabla 9. Perfil de ácidos grasos (expresado como % del total de AG) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de <i>Haematococcus pluvialis</i> . Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Se muestra el error estándar para n=8 en el caso de los cultivos en suficiencia (15 mM) y n=16 para los cultivos en limitación de nitrato (2 mM). Los ácidos grasos destacados en negrita mostraron diferencias significativas ($p<0,05$).	103
Tabla 10. Contenido en aminoácidos libres (expresado como nanomoles/mg biomasa) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de <i>Haematococcus pluvialis</i> . Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Se muestra el error estándar para n=8 en el caso de los cultivos en suficiencia (15 mM) y n=16 para los cultivos en limitación de nitrato (2 mM). Los aminoácidos destacados en negrita mostraron diferencias significativas ($p<0,05$).	104
Tabla 11. Contenido en ácidos orgánicos (expresado como nanomoles por mg de biomasa) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de <i>Haematococcus pluvialis</i> . Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Se muestra el error estándar para n=8 en el caso de los cultivos en suficiencia (15 mM) y n=16 para los cultivos en limitación de nitrato (2 mM). Las diferencias son significativas para $p<0,05$	105

- Tabla 12.** Contenido en azúcares (expresado como nanomoles por mg de biomasa) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Se muestra el error estándar para n=8 en el caso de los cultivos en suficiencia (15 mM) y n=16 para los cultivos en limitación de nitrato (2 mM). Los azúcares destacados en negrita mostraron diferencias significativas ($p<0,05$).106
- Tabla 13.** Parámetros fotosintéticos para una irradiancia PAR de $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. **ETR**: tasa fotosintética de transporte de electrones del PSII; **Y (II)**: rendimiento del PSII; **NPQ**: disipación de calor; **F_v/F_m**: eficiencia fotosintética. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Las diferencias son significativas para $p<0,05$108
- Tabla 14.** Contenido en carotenoides (expresado como % en la biomasa) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de oscuridad. Se muestran valores de error estándar para n=4. Las diferencias son significativas para $p<0,05$109
- Tabla 15.** Perfil de ácidos grasos (expresado como % del total de AG) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de oscuridad. Se muestran valores de error estándar para n=4. Los ácidos grasos destacados en negrita mostraron diferencias significativas ($p<0,05$).110
- Tabla 16.** Contenido en aminoácidos libres (expresado como nanomoles/mg biomasa) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de oscuridad. Se muestran valores de error estándar para n=4. Los aminoácidos destacados en negrita mostraron diferencias significativas ($p<0,05$).111
- Tabla 17.** Contenido en ácidos orgánicos (expresado como nmol por mg de biomasa) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de oscuridad. Se muestran valores de error estándar para n=4. Los ácidos orgánicos destacados en negrita mostraron diferencias significativas ($p<0,05$).112
- Tabla 18.** Contenido en azúcares (expresado como nmol/mg de biomasa) y porcentaje de variación respecto a la condición de 15 mM de nitrato en cultivos continuos de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales descritas en la Figura 30. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el

inicio del periodo de oscuridad. Se muestran valores de error estándar para $n=4$. Los azúcares destacados en negrita mostraron diferencias significativas ($p<0,05$).	113
---	-----

a	Coeficiente de absorción
Å	Ángstrom
Ø	Diámetro
BKT	<i>β-caroteno cetolasa</i>
C _b	Concentración de biomasa
CG-MS	Cromatografía de gases-masas
CtR-b	<i>β-caroteno hidroxilasa</i>
D	Velocidad de dilución
ETR (II)	Flujo de transferencia de electrones del fotosistema II
E _{PAR}	Energía fotosintéticamente activa
fAQ _{PSII}	Fracción de energía absorbida por el PSII
F ₀	Fluorescencia basal o mínima
F'	Fluorescencia basal o mínima de células adaptadas a luz
F _M	Fluorescencia máxima
F _M '	Fluorescencia máxima de células adaptadas a luz
F _V	Fluorescencia variable
GABA	Ácido γ-aminobutírico (aminoácido no proteico)
I ₀	Irradiancia incidente, μE m ⁻² s ⁻¹
I _{0 MAX}	Irradiancia incidente máxima, μE m ⁻² s ⁻¹
MBB	MiniBead Beater
MCW	Metanol: Cloroformo: Agua
MTX	Metoxamina
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
MS	Espectrometría de masas
NPQ	Disipación de energía no fotoquímica (<i>Non Photochemical Quenching</i>)
PAM	Técnica fluorimétrica del pulso de saturación (<i>Pulse of Amplitude Modulated</i>)
PSII	Fotosistema II

P _{astaxantina}	Productividad de astaxantina, mg g ⁻¹ d ⁻¹
P _{biomasa}	Productividad de biomasa, g l ⁻¹ d ⁻¹
PBS	Tampón fosfato salino
Q _A	Quinona A
qP	Extinción fotoquímica
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RT	Tiempo de retención
SEN (SNI)	Suministro específico de nitrato, mmol g ⁻¹ d ⁻¹
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
TCA	Ciclo del Ácido Cítrico
Y (II)	Rendimiento del fotosistema II
ZT	“Zero Time”; tiempo transcurrido (horas) desde el inicio del periodo de iluminación

Tabla A.1. Efecto de la concentración de nitrato y la velocidad de dilución sobre crecimiento, acumulación de astaxantina y contenido en nitrógeno de la biomasa de *Haematococcus pluvialis* en cultivo continuo. Condiciones experimentales: temperatura 25 °C, pH 7, ciclo solar simulado $I_0 \text{ MAX}$ 2500 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y caudal de aire 16,7 l aire (l cultivo) $^{-1} \text{ h}^{-1}$. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de iluminación. Se muestra el error estándar para n=4. Las diferencias son significativas para $p>0,05$.

	D (d^{-1})	Biomasa (g l^{-1})	Astaxantina (%)	Nitrógeno (%)	C/N
15 mM	0,9	0,60 \pm 0,03	0,024 \pm 0,000	6,9 \pm 0,2	6,6 \pm 0,1
	0,8	0,89 \pm 0,03	0,015 \pm 0,005	8,0 \pm 0,5	5,8 \pm 0,3
	0,7	1,02 \pm 0,03	0,010 \pm 0,000	7,9 \pm 0,1	6,0 \pm 0,1
	0,5	1,21 \pm 0,05	0,005 \pm 0,000	7,7 \pm 0,3	6,5 \pm 0,1
	0,3	1,94 \pm 0,06	0,025 \pm 0,005	7,0 \pm 0,2	6,6 \pm 0,1
5 mM	0,9	0,92 \pm 0,02	0,045 \pm 0,006	6,2 \pm 0,4	7,7 \pm 0,3
	0,8	0,88 \pm 0,03	0,021 \pm 0,005	6,7 \pm 0,2	6,8 \pm 0,2
	0,7	1,08 \pm 0,06	0,048 \pm 0,005	6,3 \pm 0,8	7,3 \pm 0,3
	0,5	1,40 \pm 0,04	0,051 \pm 0,003	6,1 \pm 0,4	7,7 \pm 0,7
	0,3	2,51 \pm 0,04	0,059 \pm 0,004	6,2 \pm 0,6	7,9 \pm 0,5
3 mM	0,9	0,60 \pm 0,03	0,044 \pm 0,000	6,6 \pm 0,0	6,8 \pm 0,0
	0,8	0,98 \pm 0,06	N.D	N.D	N.D
	0,7	1,04 \pm 0,07	0,268 \pm 0,002	4,8 \pm 0,6	9,7 \pm 0,8
	0,5	0,90 \pm 0,04	0,261 \pm 0,005	3,7 \pm 0,1	12,7 \pm 0,4
	0,3	2,24 \pm 0,05	0,330 \pm 0,001	3,4 \pm 0,1	14,8 \pm 0,7
2 mM	0,9	0,35 \pm 0,02	0,190 \pm 0,014	6,1 \pm 0,2	7,8 \pm 0,3
	0,8	0,79 \pm 0,02	0,302 \pm 0,011	4,7 \pm 0,2	9,9 \pm 0,2
	0,7	0,92 \pm 0,03	0,270 \pm 0,014	4,6 \pm 0,3	10,2 \pm 0,5
	0,5	1,09 \pm 0,04	0,380 \pm 0,016	3,6 \pm 0,1	14,4 \pm 0,9
	0,3	1,89 \pm 0,03	0,634 \pm 0,013	2,2 \pm 0,1	23,4 \pm 1,1
1 mM	0,9	0,31 \pm 0,01	0,135 \pm 0,015	4,2 \pm 0,1	10,9 \pm 0,2
	0,8	0,46 \pm 0,03	0,286 \pm 0,009	3,0 \pm 0,1	15,3 \pm 0,0
	0,7	0,71 \pm 0,02	0,306 \pm 0,030	2,7 \pm 0,1	17,4 \pm 0,4
	0,5	0,64 \pm 0,03	0,734 \pm 0,012	2,8 \pm 0,6	16,7 \pm 0,0
	0,3	3,28 \pm 0,01	0,711 \pm 0,028	1,7 \pm 0,1	29,3 \pm 0,6

*N.D: no determinado

Tabla A.2. Crecimiento y contenido en nitrógeno de la biomasa de cultivos en limitación (2 mM nitrato) de *Haematococcus pluvialis* sometidos a ciclos de luz-oscuridad (12:12) a dos velocidades de dilución ensayadas. Condiciones experimentales: temperatura 25 °C, pH 7, luz constante 1300 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y caudal de aire 16,7 l aire (l cultivo) $^{-1} \text{h}^{-1}$. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de iluminación. Se muestra el error estándar para n=4. Las diferencias son significativas para $p < 0,05$.

D (d^{-1})	Biomasa (g l^{-1})	Nitrógeno (%)	C/N
0,8	$0,47 \pm 0,02$	$6,03 \pm 0,01$	$7,9 \pm 0,0$
0,7	$0,46 \pm 0,03$	$5,43 \pm 0,09$	$8,9 \pm 0,2$

Tabla A.3. Crecimiento, contenido en astaxantina y en nitrógeno de la biomasa de cultivos en suficiencia (15 mM) y limitación de nitrato (2 mM) de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales: velocidad de dilución 0,8 d^{-1} , temperatura 25 °C, pH 7, ciclo solar simulado $I_0 \text{ MAX}$ 2000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y caudal de aire 16,7 l aire (l cultivo) $^{-1} \text{h}^{-1}$. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de iluminación. Se muestra el error estándar para n=8 en el caso de los cultivos en suficiencia y n=16 para los cultivos en limitación de nitrato. Las diferencias son significativas para $p < 0,05$.

	Biomasa (g l^{-1})	Astaxantina (%)	Nitrógeno (%)	C/N
15 mM	$0,90 \pm 0,06$	$0,014 \pm 0,002$	$6,8 \pm 0,07$	$6,8 \pm 0,1$
2 mM	$0,75 \pm 0,04$	$0,208 \pm 0,036$	$4,6 \pm 0,28$	$10,2 \pm 0,6$

Tabla A.4. Crecimiento y contenido en astaxantina de cultivos en suficiencia (15 mM) y limitación (2 mM) de *Haematococcus pluvialis*. Condiciones experimentales: velocidad de dilución 0,8 d^{-1} , temperatura 25 °C, pH 7, ciclo solar simulado $I_0 \text{ MAX}$ 2000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y caudal de aire 16,7 l aire (l cultivo) $^{-1} \text{h}^{-1}$. Muestras tomadas transcurridas 6 horas desde el inicio del periodo de iluminación y oscuridad respectivamente. Se muestran valores de error estándar para n=4. Las diferencias son significativas para $p < 0,05$.

	Muestras tomadas en luz		Muestras tomadas en oscuridad	
	Biomasa (g l^{-1})	Astaxantina (%)	Biomasa (g l^{-1})	Astaxantina (%)
15 mM	$0,90 \pm 0,06$	$0,014 \pm 0,002$	$0,80 \pm 0,05$	$0,013 \pm 0,001$
2 mM	$0,75 \pm 0,04$	$0,208 \pm 0,036$	$0,64 \pm 0,06$	$0,210 \pm 0,020$